

**Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Analytická chemie



**Mgr. Veronika Dufková**

Vývoj separačních metod stanovení perfluoralkylových karboxylových kyselin ve  
vzorcích životního prostředí  
Development of separation methods for determination of perfluoroalkyl carboxylic  
acids in environmental samples

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

RNDr. Radomír Čabala, Ph.D.

Praha, 2012

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 16.1.2012

**Poděkování:**

Na tomto místě bych ráda poděkovala mému školiteli RNDr. Radomíru Čabalovi, Ph.D. za jeho pomoc při shromažďování odborné literatury, za trpělivost a rady poskytnuté během měření a vypracovávání této práce. Dále bych chtěla poděkovat Prof. Franku Michaelu Matysikovi, Dr. a RNDr. Martinu Štíchovi za pomoc, poskytnutou při měření mimo Katedru analytické chemie. Velký dík také patří mé rodině a přátelům za podporu potřebnou k vypracování této práce.

Tato disertační práce byla finančně podporována projekty č. 40908 a SVV 2011-263204 Grantové agentury Univerzity Karlovy, výzkumnými záměry MŠM 0021620857 a RP14/63 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy a projektem č. CZ0116 Norského finančního mechanismu.

**Klíčová slova:** perfluoralkylové karboxylové kyseliny, analýza vodných vzorků, chlormravenčany

**Předmětová hesla:** plynová chromatografie, derivatizace, extrakce na tuhé fázi, kapilární elektroforéza, hmotnostní detekce

## Abstrakt

Byla vypracována kompletní, citlivá a selektivní metoda stanovení perfluoralkylových karboxylových kyselin (PFCA,  $C_5 - C_{12}$ ) ve vzorcích říčních vod metodou plynové chromatografie. Nejprve byla vyvinuta a optimalizována rychlá derivatizační reakce účinkem chlormravenčanu isobutylnatého, při které jsou jednotlivé perfluoralkylkarboxylové kyseliny převedeny na jejich těkavější isobutylestery.

Dalším úkolem bylo nalezení nejvhodnější stacionární fáze pro separaci těchto analytů. Byly proměřeny retenční charakteristiky isobutylesterů PFCA na 9 běžně dostupných kapilárních kolonách s různými stacionárními fázemi. Na vybrané koloně Rtx-200MS byly sledovány fyzikálně-chemické parametry interakce analytů se stacionární fází a tyto parametry byly porovnány s nefluorovaným homologem (kyselinou oktanovou).

K dispozici byl velmi citlivý plynový chromatograf s negativní chemickou ionizací, který je vhodný pro vybraný druh fluorovaných látek. Důkazem jsou i naměřené instrumentální limity detekce a stanovitelnosti, které se pohybují pro isobutylestery PFCA v rozmezí  $0,05 - 9,7 \text{ ng mL}^{-1}$  (LOD) a  $0,16 - 32,2 \text{ ng mL}^{-1}$  (LOQ).

Dalším krokem naší práce bylo nalezení vhodné prekoncentrační techniky pro reálné vodné vzorky. Takovou metodou se stala extrakce na tuhé fázi s využitím SPE kolonek Supel<sup>TM</sup>-Select HLB, kde byly analyty zachytávány ve formě iontového páru. Touto technikou došlo k 400-násobnému zkoncentrování vodných vzorků, dosažené recovery v říčních vodách se pohybovalo v rozmezí 53 – 111 % v závislosti na délce perfluorovaného řetězce. Tato metoda byla následně testována na vzorcích vod z Vltavy a Labe odebraných během podzimu 2010 a zimy 2011. Ve všech analyzovaných vzorcích byla nalezena PFOA v koncentračním rozpětí 4 (LOD) – 28  $\text{pg mL}^{-1}$  a PFNA v rozmezí 0,1 (LOQ) – 4  $\text{pg mL}^{-1}$ . Vyvinutá metoda je tedy použitelná pro stanovení PFCA ve vzorcích životního prostředí.

Posledním úkolem této práce bylo srovnání dané metody s dalšími separačními technikami, tedy s HPLC-MS a CE-MS. Optimalizovaná metoda CE-MS byla ve spojení s použitou SPE prekoncentrační metodou testována na vzorcích říční vody Dunaje. Koncentrace analytů se však pohybovaly pod mezí detekce této metody.

Srovnáním těchto technik lze říci, že výhodou kapilární elektroforézy byla rychlost separace 10 analytů do 3 minut, výhodou metody GC-NCI-MS zase její citlivost.

## Abstract

A complete, sensitive and selective procedure was developed for gas chromatographic determination of perfluoroalkyl carboxylic acids (PFCAs, C<sub>5</sub> – C<sub>12</sub>) in river water samples. A rapid and simple derivatization procedure was developed and optimized at first, using isobutyl chloroformate (IBCF) to convert the acids into the more volatile isobutyl esters.

The second task was to find the most suitable stationary phase for separation of perfluoroalkyl carboxylic acids by GC. The retention characteristics of PFCA isobutyl esters were measured and compared on 9 different stationary phases. The physical-chemical parameters of analyte interactions with stationary phase were monitored on selected column Rtx-200MS, and these parameters were compared with a non-fluorinated homologue – octanoic acid.

A sensitive GC-MS system was used with negative chemical ionization, which is suitable for the selected type of fluorinated analytes. The developed method exhibits very low limits of detection and determination of PFCA isobutyl esters: 0.05 – 9.7 ng mL<sup>-1</sup> (LOD) and 0.16 – 32.2 ng mL<sup>-1</sup> (LOQ).

An optimum pre-concentration technique was found for real water samples, where SPE Supel<sup>TM</sup>-Select HLB cartridges were used. In these cartridges, PFCAs were captured as ion-pairs with enrichment factor of 400. The recoveries of the PFCAs in the spiked river water samples are within the range from 53 to 111%, depending on the lengths of the perfluorinated chains of the acids. The practical applicability of this technique was tested on the Vltava river and the Elbe river water samples collected during autumn 2010 and winter 2011. All the analyzed samples contained PFOA and PFNA with concentration ranges from 4 (LOD) to 28 and 1 to 4 pg mL<sup>-1</sup>, respectively. The last step in our work was comparing this method with other separation techniques, such as HPLC-MS and CE-MS. The Danube river samples were tested using SPE pre-concentration step followed by the optimized CE-MS method. However, this method was not sensitive enough and the PFCA concentrations in Danube samples were obtained under the LOD values.

On one hand, the advantage of CE-MS method is short analysis time – separation of 10 analytes (C<sub>5</sub> – C<sub>14</sub>) just in 3 minutes, on the other hand, advantage of GC-NCI-MS method is its huge sensitivity.

## Obsah:

1.	Úvod.....	10
2.	Teoretická část .....	11
2.1	Perfluorované sloučeniny .....	11
2.1.1	Fyzikálně-chemické vlastnosti .....	11
2.1.2	Výroba perfluorovaných chemikálií.....	14
2.1.3	Průmyslové využití perfluorovaných chemikálií.....	16
2.1.4	Potenciální zdroje znečištění a transport PFCA v životním prostředí .....	17
2.1.5	Toxicita a ekotoxicita .....	20
2.2	Analytická chemie PFCA .....	21
2.2.1	Stanovení PFCA metodou GC s použitím derivatizace .....	22
2.2.2	Stanovení PFCA metodou HPLC-MS.....	23
2.2.3	Stanovení PFCA metodou kapilární zónové elektroforézy .....	27
2.2.4	Používané extrakční metody pro stanovení PFC ve vzorcích životního prostředí.....	27
2.2.4.1	Extrakce na tuhé fázi.....	27
2.2.4.2	Mikroextrakce na tuhé fázi .....	28
2.2.4.3	Iontově-párová extrakce.....	29
2.3	Charakterizace interakcí analytu se stacionární fází v plynové chromatografii .....	30
2.4	Teorie SPE - extrakce tuhými fázemi.....	33
2.5	Metody určení LOD a LOQ .....	36
3.	Experimentální část.....	38
3.1	Standardy a chemikálie .....	38
3.2	Přístrojové vybavení.....	38
3.3	Odběr reálných vzorků .....	41
3.4	Příprava zásobních roztoků .....	41
3.5	Příprava vodných vzorků k SPE extrakci .....	42
3.6	Zakoncentrování a extrakce.....	43
3.7	Derivatizace.....	44
3.8	GC analýza .....	45
3.9	HPLC-ESI(-)-MS analýza .....	46
3.10	CE-ESI(-)-MS analýza .....	47
4.	Výsledky a diskuse.....	49
4.1	Plynová chromatografie .....	49
4.1.1	Kvalitativní analýza PFCA .....	49
4.1.1.1	Vývoj derivatizační reakce.....	49
4.1.1.2	Analýza isobutylesterů PFCA pomocí GC-ECD .....	49
4.1.1.3	Analýza isobutylesterů PFCA pomocí GC-EI-MS.....	50

4.1.1.4	Analýza isobutylestrů PFCA pomocí GC-NCI-MS .....	52
4.1.1.5	Výběr vhodné stacionární fáze a proměření retenčních charakteristik isobutylesterů PFCA .....	53
4.1.1.6	Retence a termodynamické parametry isobutylesterů PFCA na koloně Rtx-200MS.....	56
4.1.2	Kvantitativní analýza .....	61
4.1.2.1	Srovnání limitů detekce GC-ECD a GC-EI-MS pro prostředí acetonitrilu .....	61
4.1.2.2	Derivatizační reakce ve vodném prostředí .....	62
4.1.2.3	Srovnání limitů detekce GC-EI-MS a GC-ECD ve fosfátovém pufru .....	64
4.1.2.4	LOD a LOQ dosažené na GC-NCI-MS .....	65
4.1.2.5	Srovnání dosažených limitů detekce a stanovitelnosti všech používaných metod.....	66
4.1.3	Vzorky vod.....	67
4.2	Vývoj extrakční a prekoncentrační metody.....	68
4.2.1	Určení zdrojů kontaminace .....	69
4.2.2	Vývoj SPE metody.....	69
4.2.2.1	Optimalizace pH.....	70
4.2.2.2	Výběr elučního činidla .....	71
4.2.2.3	Přídavek NaCl .....	71
4.2.2.4	Přídavek iontově-párového činidla.....	72
4.2.2.5	Kombinace přídavku TBABr a NaCl .....	73
4.2.3	Extrakční účinnost u spikovaných vzorků říční vody .....	73
4.2.4	Reálné vzorky říčních vod .....	74
4.2.4.1	Vzorky Vltavy.....	74
4.2.4.2	Vzorky Labe.....	76
4.2.4.3	Shrnutí aplikace metody na říční vzorky.....	78
4.3	Analýza PFCA vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí .....	78
4.4	Analýza PFCA kapilární elektroforézou s hmotnostní detekcí .....	79
4.4.1	Optimalizace CE-MS separace ve vodném elektrolytu.....	80
4.4.1.1	Optimalizace složení elektrolytu .....	80
4.4.1.2	Optimalizace koncentrace mravenčanu amonného .....	81
4.4.1.3	Optimalizace přídavku acetonitrilu do elektrolytu .....	82
4.4.2	Optimalizace CE-MS separace v nevodném elektrolytu.....	83
4.4.2.1	Optimalizace koncentrace octanu amonného .....	84
4.4.2.2	Optimalizace koncentrace kyseliny octové .....	85
4.4.3	Porovnání separace, limitů detekce a stanovitelnosti mezi jednotlivými separačními metodami .....	88



4.4.4	Reálné vzorky Dunaje .....	89
4.4.5	Shrnutí CE-TOF-MS metody .....	94
4.4.6	Testování optimalizované metody na CE-qqqMS/MS .....	94
5.	Závěr .....	98
6.	Seznam zkratk .....	100
7.	Použitá literatura .....	102
8.	Přílohy .....	110
<u>Příloha 1:</u> Seznam publikací, prezentací a plakátových sdělení .....		110
<u>Příloha 2:</u> Dufková V.; Čabala R.; Ševčík V.: Determination of C5 - C12 perfluoroalkyl carboxylic acids in river water samples in the Czech Republic by GC-MS after SPE preconcentration, <i>Chemosphere</i> , in press, doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.12.029 (2012) .....		111
<u>Příloha 3:</u> Dufková V.; Čabala R.; Maradová D.; Štícha M.: A fast derivatization procedure for gas chromatographic analysis of perfluorinated organic acids, <i>J. Chromatogr. A</i> <b>1216</b> , 8659-8664 (2009) .....		118
<u>Příloha 4:</u> Dufková V.; Čabala R.: Fast Derivatization Method for Analysis of Perfluorinated Organic Acids by GC, příspěvek ve sborníku 5 <sup>th</sup> <i>ISC Modern Analytical Chemistry</i> , ISBN 978-80-86561-41-7 (2009) .....		124
<u>Příloha 5:</u> Dufková V.; Čabala R.: Retention of isobutyl esters of perfluorinated carboxylic acids on various stationary phases – ve stadiu přípravy .....		129

# 1. Úvod

Tématem této práce je vývoj citlivé a selektivní metody stanovení perfluorovaných organických sloučenin, konkrétně karboxylových kyselin s délkou perfluorovaného řetězce C5 – C12, metodou plynové chromatografie. Tyto látky patří do široké skupiny tzv. perfluorovaných sloučenin (PFC), které byly a stále ještě jsou hojně průmyslově využívány. V posledních letech bylo zjištěno, že PFC patří mezi polutanty nacházející se ve všech složkách životního prostředí, řadí se mezi tzv. POPs – perzistentní organické polutanty. Důvodem je jejich vysoká odolnost vůči odbourávacím procesům a bioakumulativní charakter těchto látek. Stále proto přibývá vědců z celého světa, kteří se touto problematikou zabývají a každým rokem narůstá počet publikací v odborné literatuře o stanovení různými analytickými metodami, zjišťování toxicity a studiem vlastností PFC. V České republice toto téma ale zatím není dostatečně zpracováno a proto se stalo předmětem našich studií.

Cílem této práce je vývoj a optimalizace metody pro stanovení již zmíněných perfluoralkylových karboxylových kyselin ve vybraných složkách životního prostředí metodou plynové chromatografie a porovnání této metody s dalšími separačními technikami, jako je například kapalinová chromatografie a kapilární elektroforéza.

## 2. Teoretická část

### 2.1 Perfluorované látky

#### 2.1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Perfluorované sloučeniny (PFC) jsou organické látky antropogenního původu, u kterých jsou všechny vodíky v alkylovém řetězci nahrazeny atomy fluoru. Typická struktura PFC má lineární řetězec s 1 až 14 atomy uhlíku:

$F - (CF_2)_n - X$ , kde  $n = 1 - 13$  a  $X = -(CH_2)_2-OH, -COOH, -SO_3H, -SO_2NH_2$  [1].

V našem případě se jedná konkrétně o perfluoralkylové karboxylové kyseliny (PFCA), jejichž typickou strukturu lze znázornit takto:  $F - (CF_2)_n - COOH$ ,  $n = 1 - 13$ . V tabulce 1 je stručný přehled vybraných charakteristik a fyzikálně-chemických konstant náležících jednotlivým perfluoralkylkarboxylovým kyselinám, kterým se tato práce věnuje.

Tabulka 1 – Perfluoralkylkarboxylové kyseliny a jejich dostupné fyzikálně-chemické vlastnosti

<i>název</i>	<i>zkratka</i>	<i>souhrnný vzorec</i>	<i>CAS number</i>	<i>mol. hmotnost (g mol<sup>-1</sup>)</i>	<i>bod varu (°C)</i>	<i>bod tání (°C)</i>	<i>hustota při 25°C (g mL<sup>-1</sup>)</i>
Perfluorpentanová kyselina	PFPeA	C <sub>5</sub> HF <sub>9</sub> O <sub>2</sub>	2706-90-3	264,05	140	-	1,713
Perfluorhexanová kyselina	PFHxA	C <sub>6</sub> HF <sub>11</sub> O <sub>2</sub>	307-24-4	314,06	-	-	1,759
Perfluorheptanová kyselina	PFHpA	C <sub>7</sub> HF <sub>13</sub> O <sub>2</sub>	375-85-9	364,06	175	-	1,792
Perfluoroktanová kyselina	PFOA	C <sub>8</sub> HF <sub>15</sub> O <sub>2</sub>	335-67-1	414,06	189	55-56	0,900
Perfluornonanová kyselina	PFNA	C <sub>9</sub> HF <sub>17</sub> O <sub>2</sub>	375-95-1	464,08	218	59-62	-
Perfluordekanová kyselina	PFDA	C <sub>10</sub> HF <sub>19</sub> O <sub>2</sub>	335-76-2	514,08	218	77-81	-
Perfluorundekanová kyselina	PFA	C <sub>11</sub> HF <sub>21</sub> O <sub>2</sub>	2058-94-8	564,10	160*	96-101	-
Perfluordodekanová kyselina	PFDoA	C <sub>12</sub> HF <sub>23</sub> O <sub>2</sub>	307-55-1	614,10	245	105-108	-
Perfluortridekanová kyselina	PFTTrA	C <sub>13</sub> HF <sub>25</sub> O <sub>2</sub>	72629-94-8	664,11	-	112-123	-
Perfluortetradekanová kyselina	PFTTeA	C <sub>14</sub> HF <sub>27</sub> O <sub>2</sub>	376-06-7	714,12	270	130-135	-

hodnoty bodů varu jsou uváděny při 987 hPa, \* při 80 hPa

Perfluorované sloučeniny jsou bioakumulativní a potenciálně škodlivé syntetické chemikálie, přirozeně se nevyskytující v životním prostředí a proto jim je v dnešní době věnována velká pozornost. Mají unikátní fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti určené především velice pevnou vazbou mezi uhlíkem a fluorem. Vysoce polarizovaná vazba C-F je jednou z nejsilnějších kovalentních vazeb (střední energie vazby C-F při 25 °C je 441 kJ mol<sup>-1</sup>) [1,2]. Díky tomu jsou tyto látky odolné vůči hydrolyze, fotolýze, biodegradaci a procesům v metabolismu [3,4]. Perfluorované sloučeniny jsou také teplotně stabilnější než jejich analogické uhlovodíky. Konkrétně

perfluoralkylkarboxylové a perfluoralkylsulfonové kyseliny jsou z PFC považovány za teplotně nejstálejší [3,5].

Perfluorované sloučeniny mají vlastnosti takzvaného „supersurfaktantu“, což znamená, že to jsou povrchově aktivní látky odpuzující vodu i mastnotu zároveň. Toho bylo hojně využíváno v mnoha průmyslových odvětvích (viz dále v kap. 2.1.3). Díky tomu se mohou PFC dostávat do odpadních vod, kde se sorbují na splaškový kal. Dalším využíváním splaškového kalu při hnojení zemědělských ploch dochází k ukládání perfluorovaných sloučenin do půd a díky jejich polaritě a pohyblivosti se opět mohou vyplavovat do podzemních vod v téměř nezměněné podobě [6,7]. Akumulace a osud neutrálních organohalogenovaných sloučenin v životním prostředí lze předpovídat z některých fyzikálně-chemických konstant, jako je například rozdělovací koeficient mezi oktanolem a vodou ( $K_{ow}$ ). Modely, vycházející z tohoto koeficientu, však nejsou příliš vhodné pro charakterizaci perfluorovaných sloučenin. Je to dáno jejich současně lipofobním, tak hydrofobním perfluorovaným řetězcem. Běžné je také to, že pokud jsou fyzikálně-chemická data známá, často nekorespondují s naměřenými výsledky získanými různými laboratořemi a různými metodami. Příkladem může být výsledek studií provedené Gossovou a kol. [8,9]. V těchto studiích vědci poukazují na fakt, že uhlovodíky s fluorovaným řetězcem mnohem více přecházejí do organické fáze a mají jen malou tendenci zůstat ve vodné fázi, než by se očekávalo podle dostupných dat. Neutrální forma PFOA má odhadovanou hodnotu  $\log K_{ow} = 4,3$  a  $\log K_{vzduch/voda} = -2,4$ , což naznačuje, že sorpce na částice v půdě a sedimenty, stejně tak i vypařování a transport ve vzduchu, budou hrát důležitou roli v procesech těchto látek v životním prostředí. Naopak u perfluoroktanoátu (PFO) se neočekává přechod do vzduchu ani sorpce na sediment a půdy, které obvykle nesou záporný náboj [8-10]. Tyto údaje podtrhují důležitost biomonitoringu pro pochopení chování a osudu perfluorovaných látek v životním prostředí. Pokud budou výsledky pečlivě a přesně interpretovány, analýzy vzorků životního prostředí mohou poskytnout cenné informace o působení, zdrojích, transportních mechanismech, bioakumulačním potenciálu a globální distribuci těchto chemikálií [11].

Zajímavá je situace s  $pK_a$  u těchto látek. Od výrobce je tato informace dostupná jen pro kyselinu perfluoroktanovou, kde je uváděna hodnota  $pK_a = 2,6$  [12]. Prevederous uvádí hodnotu  $pK_a$  také mezi 2 – 3 [13]. Existuje však několik dalších publikací,

zabývajících se přímo měřením a modelováním výpočtů  $pK_a$  a výsledky z těchto studií se značně liší. Například ve studiích Alzagy a kol. je uváděno, že  $pK_a$  pro perfluoroktanovou kyselinu odpovídá hodnotě 0,35 a pro další kyseliny ( $C_4 - C_{12}$ ) se pohybují  $pK_a$  v rozmezí 0,18 – 0,37 [14,15]. Tyto informace víceméně potvrzuje studie Gossové, kde byly pomocí dvou různých programů vypočítány hodnoty  $pK_a$  pro PFOA -0,11 (program SPARC) a 0,7 (program COSMO-RS). Na základě několika dalších údajů se Gossové zdají tyto hodnoty stále ještě příliš vysoké a přiklání se spíše k odhadované hodnotě odpovídající  $pK_a = -0,5$ . Ve stejném roce byla publikována také studie Burnse a kol., který stanovil potenciometricky hodnotu  $pK_a$  na 3,8 použitím směsi voda-methanol. [16]. Jelikož výsledky jednotlivých studií jsou tak odlišné, řádově až přes 4 jednotky, je zřejmé, že stanovení přesné hodnoty  $pK_a$  není vůbec jednoduché.

Nahrazení atomů fluoru v uhlovodíkovém řetězci vede také ke snížení povrchového napětí vodných roztoků a k tvorbě micel (CMC - kritická micelární koncentrace pro PFOA se pohybuje mezi 8,7 a 9,0 mmol L<sup>-1</sup>). Hodnoty CMC pro  $C_7$  a  $C_8$  perfluoralkylkarboxylové a perfluoralkylsulfonové kyseliny jsou zhruba ekvivalentní  $C_{11}$  a  $C_{12}$  alkylovým surfaktantům [5,17].

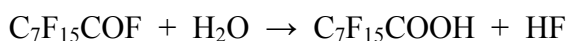
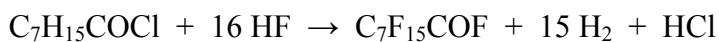
Rozpustnost perfluoroktanoátu ve vodě odpovídá hodnotě 4,1 g L<sup>-1</sup> při teplotě 22 °C a 9,5 g L<sup>-1</sup> při teplotě 25 °C. Rozpustnost PFOA nebyla dosud publikována, ale předpokládá se výrazně menší rozpustnost ve vodě než u perfluoroktanoátu [13].

### 2.1.2 Výroba perfluorovaných chemikálií

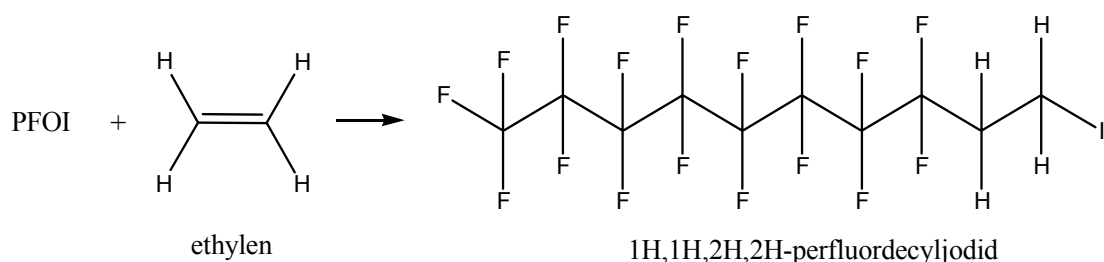
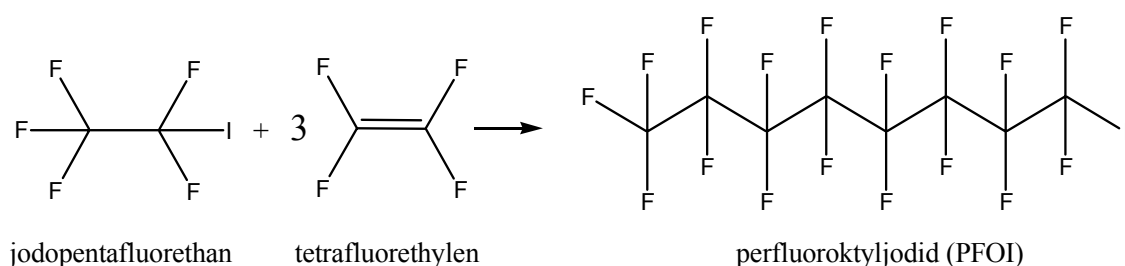
Existují dva odlišné výrobní postupy perfluorovaných látek. Prvním z nich je proces elektrochemické fluorizace, při němž dochází účinkem elektrického proudu k náhradě všech atomů vodíku v uhlovodíkovém řetězci atomy fluoru. Je to poměrně levná metoda, kterou je produkována směs převážně lineárních isomerů, rozvětvených isomerů (15 až 30 %), ale také isomerů s kratším řetězcem. Tato elektrochemická metoda byla používána k výrobě perfluoroktansulfonylfluoridu (PFOSF). Společnost 3M začala s produkcí této látky již roku 1949. PFOSF je základní chemikálií pro výrobu perfluoralkylsulfonamidalkoholů, jako např. *N*-ethylperfluoroktansulfonamidethanol (*N*-EtFOSE). Perfluoralkylsulfonamidalkoholy degradují biotickou oxidací a biotransformačními procesy na perfluoralkylsulfonáty.

Například PFOS se v přírodě uvolňuje z perfluoralkylsulfonamidalkoholů, jako je již zmiňovaný *N*-EtFOSE [11,18,19].

Pro výrobu PFOA procesem elektrochemické fluorizace se používá jako výchozí látka oktanoylchlorid. Reakce je dvoustupňová, přičemž výchozí produkt je získán hydrolyzou perfluoroktanoylfluoridu z první reakce. Průběh reakce je naznačen následujícími rovnicemi [20]:



Telomerizace je druhým důležitým výrobním procesem. Jedná se o radikálovou reakci, při níž vzniká z monomeru a iniciátoru polymerní produkt. Konkrétně jde o reakci pentafluorjodethanu s tetrafluorethylenovými oligomery za vzniku směsi perfluoralkylderivátů. Průběh reakce je naznačen na tomto schématu:



Tyto fluorotelomerní deriváty jsou používány k výrobě různých telomerních produktů, převážně fluorotelomerních alkoholů (FTOH). Polyfluorované alkoholy s dlouhým lineárním řetězcem a obecným sumárním vzorcem  $\text{C}_x\text{F}_{2x+1}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$  slouží jako meziprodukty při výrobě inkoustů, vosků, nátěrových hmot, barviv, lepidel, leštidel a různých plastů. FTOH se transformují v atmosféře a metabolizují

v organismech a mikroorganismech na fluortelomerní karboxylové kyseliny (FTCA) a perfluoralkylkarboxylové kyseliny (PFCA) [9, 21,22].

Nejdůležitějším rozdílem mezi oběma výrobními procesy je podoba a čistota výsledného produktu. Elektrochemickou fluorizací vznikají všechny typy produktů v závislosti na výchozí látce. Tento způsob využívala firma 3M k výrobě PFOSF a PFOA, dnes je však výroba zastavena. Produkty vzniklé telomerizací mají společný meziprodukt  $R_F C_2 H_4 X$  (kde  $R_F$  je perfluorovaný alkylový řetězec a X funkční skupina) a mají velmi málo vedlejších produktů. Výroba touto metodou je však velice drahá. V dnešní době proces telomerizace využívá několik firem, jako například DuPont, Clariant, Daikan a Asahi Glass [20].

### 2.1.3 Průmyslové využití perfluorovaných chemikálií

Jak již bylo zmíněno, tyto látky mají vlastnosti „supersurfaktantu“. Díky tomu, že odpuzují jak vodu, tak mastnotu, byly a v některých případech jsou stále používány k povrchové úpravě různých materiálů. Například lze zmínit papír, jehož povrch je upraven tak, aby ho bylo možno použít jako obalového nemastícího se materiálu na jídlo, kupříkladu na popcorn. Dále se využívají tyto chemikálie k povrchové úpravě koberců, kůže, čalouněných i jiných textilií, například outdoorového a voděodolného oblečení s povrchovou úpravou Teflon<sup>®</sup>, Goretex<sup>®</sup>, Bortex<sup>®</sup>, Stainmaster<sup>®</sup> a Scotchguard<sup>®</sup> [23-27].

Amonná sůl kyseliny perfluoroktanové (APFO) je jedním z prekurzorů při výrobě polytetrafluorethylenu (PTFE), který je využíván nejen k výrobě nepřilnavého nádobí, ale i v mnoha dalších průmyslových odvětvích, jako je například automobilový, letecký a elektronický průmysl. PTFE a polyvinylidenfluorid (PVDF) pak patří do skupiny tzv. fluorotelomerů a fluoroelastomerů [28-33].

PTFE je také často součástí různých laboratorních pomůcek, jako jsou např. SPE kolonky, těsnění a různé hadičky. PFOA pak může být přítomna ve stopových množstvích v těchto produktech a lze ji detekovat např. v běžných rozpouštědlech užívaných v HPLC [34].

V dnešní době se na trhu s kuchyňskými potřebami začínají objevovat firmy, například GreenPan<sup>™</sup>, které nabízejí nepřilnavé pánve bez obsahu PTFE a PFOA. Jedná se o keramický materiál patentovaný pod názvem Thermolon<sup>™</sup> [35].



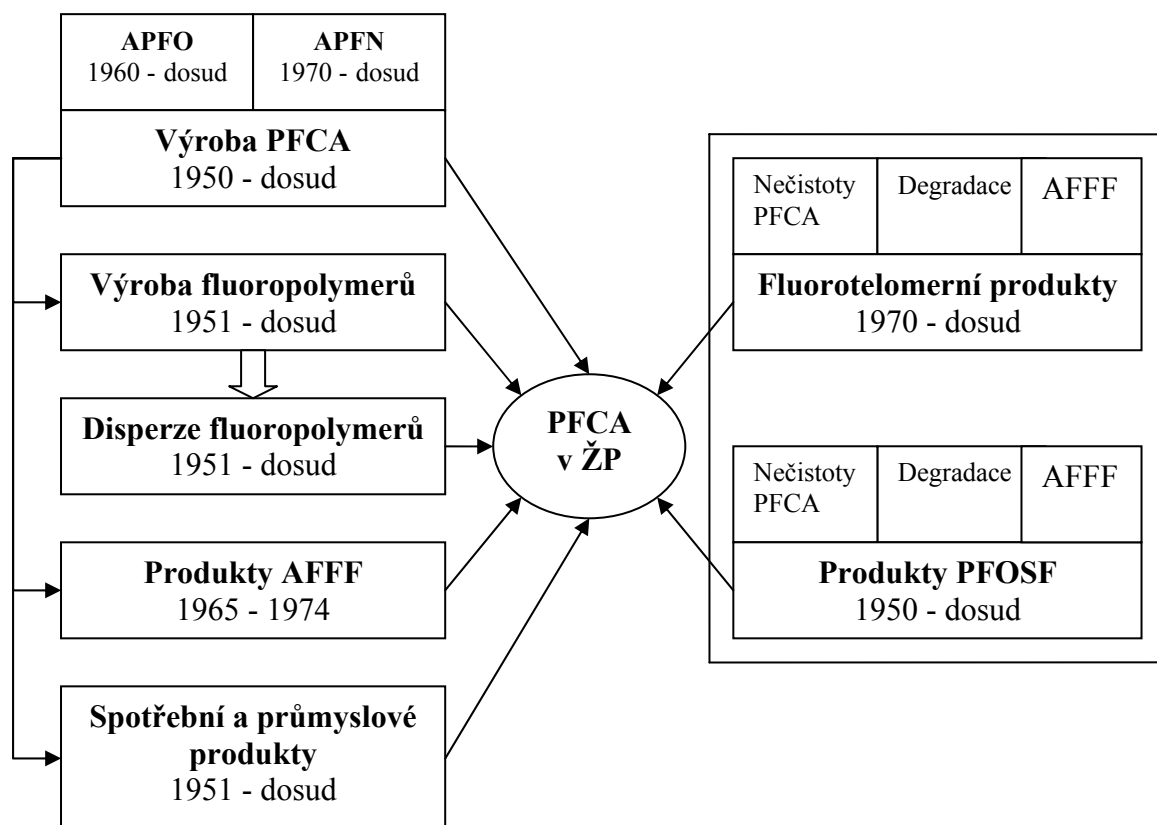
Perfluorované sloučeniny se dále používají jako změkčovadla v mazacích a hydraulických olejích, v nátěrových hmotách, lepidlech, leštidlech, ale jsou také obsaženy v různých farmaceutických a kosmetických přípravcích [1,3,25,36]. Ve fotografickém průmyslu se využívají tyto látky k pokovování a dále se uplatňují při výrobě polovodičů a izolačních materiálů v telekomunikacích [37].

V zemědělství se využívá *N*-ethylperfluoroktansulfonamid, který patří mezi specifické insekticidy používané proti termitům a mravencům. Jeho metabolitem je bioakumulativní perfluoroktansulfonamid (PFOSA) [38].

PFC jsou také odolné vůči vysokým teplotám a ohni a mají vlastnosti inhibitoru koroze [39]. Proto speciální hasící pěny obsahují některé soli perfluoralkylsulfonových kyselin, které podporují tvorbu vodní pěny (aqueous film forming foam, AFFF). V USA se začaly tyto pěny používat již v polovině 60. let 20. století brzy po jejich objevení. Společnost 3M byla až do roku 2001 největším dodavatelem tohoto produktu hlavně pro americkou armádu. AFFF jsou především vhodné k hašení hořlavých kapalin, jako je např. benzín. Proto ke znečištění životního prostředí perfluorovanými látkami, zejména povrchové a podzemní vody, dochází nejčastěji na armádních základnách, letištích a v tréninkových táborech hasičských sborů [5,40,41].

#### **2.1.4 Potenciální zdroje znečištění a transport PFCA v životního prostředí**

Na obrázku 2.1 je načrtnut přehled potenciálních zdrojů kontaminace životního prostředí perfluorovanými chemikáliemi.



Obrázek 2.1 – Potenciální zdroje znečištění životního prostředí perfluoralkylkarboxylovými kyselinami: APFO - amonná sůl kyseliny perfluoroktanové, APFN - amonná sůl kyseliny perfluornonové, AFFF - speciální vodní protipožární pěna (aqueous fire-fighting foam) a PFOSF – perfluoroktysulfonylfluorid [13]

Jedním z meziproduktů při výrobě fluoropolymerních materiálů je také tzv. fluoropolymerní disperze („Fluoropolymer dispersion“). Většina fluoropolymerů na bázi PTFE je prodávána v granulovaném stavu či tabletách, ze kterých je APFO odstraněno z 99 %. Ovšem vodné disperzní roztoky, které se také prodávají, obsahují určité množství APFO. Tyto produkty se používají k povrchové úpravě kovů a dalších materiálů. Takto upravené produkty jsou často vystavovány vysokým teplotám, při kterých dochází k rozkladu APFO. Jedná se tedy o další nepřímý zdroj kontaminace [42].

V tabulce 2 je shrnutí přímých i nepřímých zdrojů znečištění perfluoralkylkarboxylovými kyselinami, způsobených jak jejich přímou výrobou, tak

jejich následným zpracováním. Rovněž jsou uvedeny celkové odhadované produkce a emise PFCA v tunách.

Tabulka 2 – Přehled historické produkce a znečištění životního prostředí PFCA [13]

<i>Zdroj znečištění</i>	<i>období</i>	<i>Odhadovaná míra emise PFCA (t)</i>	<i>Celková celosvětová produkce (t)</i>
<b>Přímé zdroje PFCA</b>			
<b>Výroba PFCA</b>			
PFO/APFO	1951 - 2004	400 - 700	3600 - 5700
PFN/APFN	1975 - 2004	70 - 200	800 - 2300
<b>Celková výroba</b>		<b>470 - 900</b>	<b>4400 - 8000</b>
<b>Spotřební a průmyslové využití</b>			
Výroba fluoropolymerů (APFO)	1951 – 2004	2000 - 4000	
Zpracování fluoropolymerů disperzním procesem (APFO)	1951 - 2004	200 - 300	
Výroba fluoropolymerů (APFN)	1975 - 2004	400 - 1400	
Zpracování fluoropolymerů (APFN)	1975 - 2004	10 - 20	
AFFF	1965 - 1974	50 - 100	
Spotřební a průmyslové produkty	1960 - 2000	40 - 200	
<b>Celková přímá produkce</b>		<b>3200 - 6900</b>	
<b>Nepřímé zdroje PFCA</b>			
<b>Zdroje znečištění na bázi PFOSF</b>			
Zbytkové nečistoty PFCA	1960 - 2002	20 - 130	
Degradace z PFOSF	1960 - 2002	1 - 30	
AFFF na bázi PFOSF	1970 - 2002	3 - 30	
<b>Zdroje znečištění na bázi fluorotelomerů</b>			
Zbytkové nečistoty PFCA	1974 - 2004	0,3 - 30	
Degradace fluorotelomerů	1974 - 2004	6 - 130	
AFFF na bázi fluorotelomerů	1975 - 2004	< 1	
<b>Nepřímé zdroje PFCA</b>		<b>30 - 350</b>	
<b>Celkové zdroje (přímé i nepřímé) znečištění</b>		<b>3200 - 7500</b>	

Existují dva hlavní nejpravděpodobnější způsoby transportu perfluorovaných chemikálií v životním prostředí. Těkavé neutrální látky (prekurzory) se dostávají do atmosféry a mohou tak putovat dlouhé vzdálenosti až do odlehlejších oblastí, jako je např. Arktida, Antarktida atd., kde se pomalu degradují na finální produkty – PFCA a PFSA. V případě nabitých perfluorovaných sloučenin je transport uskutečňován převážně vodními zdroji, tedy povrchovou i podpovrchovou vodou. Velkou zásobárnou perfluorovaných kontaminantů jsou tedy oceány [43].

V roce 2000 ohlásila společnost 3M zastavení výroby PFOA a PFOS (složky v přípravku Scotchgard, který zvyšoval odolnost povrchů vůči barevným skvrnám), kvůli jejich stálosti v životním prostředí. V roce 2002 zahájila americká agentura životního prostředí (EPA) studii zaměřenou na stanovení PFOA a jí podobných sloučenin [44,45]. V roce 2005 výkonný výbor organizace EPA doporučil agentuře klasifikovat PFOA za potenciální lidský karcinogen [46]. V roce 2006 zahájila EPA společně s osmi nadnárodními společnostmi projekt s názvem „2010/15 PFOA Stewardship Program“, ve kterém se společnosti zavázaly snížit globální produkci výrobků obsahujících PFOA a podobné sloučeniny o 95 % do roku 2010 a úplně eliminovat produkci do roku 2015 [47].

### 2.1.5 Toxicita a ekotoxicita

Bylo prokázáno, že tyto látky jsou perzistentní v životním prostředí a mají bioakumulativní efekt v živých organismech. EPA a OECD zjistily, že expozice PFOA může u hlodavců a primátů způsobit poškození jater, protože právě v nich dochází k akumulaci PFOA a dalších perfluorovaných látek. PFOA má dále vliv na endokrinní a reprodukční funkce a snižuje koncentraci cholesterolu v séru hlodavců. Může také vyvolat významný pokles tělesné hmotnosti u krys [48-53]. Akutní toxicita je však obecně nízká [28,54]. Distributor standardů perfluoralkylkarboxylových kyselin, společnost Sigma-Aldrich uvádí hodnoty letálních dávek pro krysy  $LD_{50} = 189 \text{ mg kg}^{-1}$  u PFOA (podáváno intraperitoneálně) a  $LD_{50} = 57 \text{ mg kg}^{-1}$  pro PFDA (podáváno orálně) [12].

O účincích na člověka je toho známo zatím velice málo [55]. Epidemiologické studie ukázaly zvýšené riziko vzniku některých druhů rakoviny (nádory mužského reprodukčního systému, rakovinu močového měchýře), a to nejen mezi

dělníky ve fluorochemickém průmyslu, ale také u běžné populace v různých částech světa [48,49]. PFOA je v těle člověka velmi dobře absorbována nejen při orálním příjmu, ale i inhalací a v menší míře také dermálně. Podle studií na potkaních se nehromadí v tuku, ale váže se kovalentně na bílkoviny v játrech a v plazmě [56]. U člověka není v játrech, v plazmě, ani v ledvinách metabolizována, k exkreci dochází prostřednictvím moče a stolice. Odhaduje se, že polovina přijatého množství PFOA může být z těla člověka odstraněna za 1 – 3 roky [57]. Ve studii, ve které byly měřeny hladiny perfluorovaných sloučenin u 9 pracovních exponovaných zaměstnanců, bylo zjištěno, že poločas vyloučení z krevního séra trvá až 4,4 roku [58]. Pro exkreci PFCA je velmi důležitá délka perfluorovaného řetězce. Čím je řetězec delší, tím hůře se látky vylučují [59].

Od března roku 2010 Evropská komise doporučila členským státům EU monitorovat přítomnost PFC v jídle a pitné vodě. Agentura ochrany zdraví Velké Británie (UK Health Protection Agency) stanovila maximální přípustné koncentrace v pitné vodě na  $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$  pro PFOS a  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  pro PFOA [37,60] .

## 2.2 Analytická chemie PFCA

Pro stanovení perfluoralkylkarboxylových kyselin v nejrůznějších matricích se využívá řada analytických metod. Nejčastěji se využívají separační metody - kapalinová chromatografie či plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí a v menší míře i kapilární elektroforéza. Následující kapitoly budou zaměřeny právě na tyto metody. Jsou ale i další analytické metody, které se také používají. Zmínit lze například metodu  $^{19}\text{F}$  NMR, které se využívá ke stanovení celkové koncentrace fluoru ve vodných matricích [61]. Tato metoda však nedosahuje potřebné citlivosti ( $\text{LOD } 10 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Další metodou, kde se sleduje celkový obsah fluoru v biologických matricích je tzv. „Combustion ion chromatography“, kde dochází ke spojení spalovacího procesu matrice a iontové chromatografie [62]. Převedením organického fluoru na fluorovodík je také využito v práci Kissy [63], kde ke stanovení fluoridového aniontu je využita iontově-selektivní elektroda. Tyto metody jsou neselektivní a v porovnání nejčastěji používanými metodami HPLC-MS či GC-MS jsou jen okrajové, proto jim nebude věnována větší pozornost.

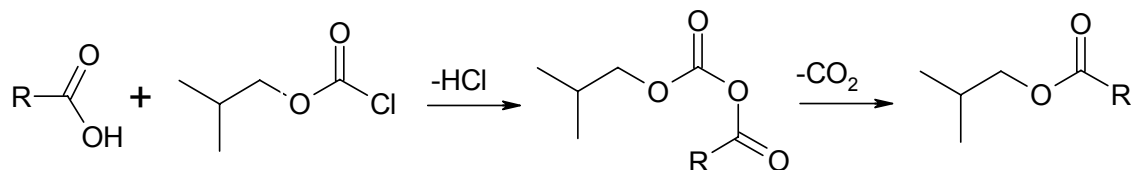
### 2.2.1 Stanovení PFCA metodou GC s použitím derivatizace

Perfluoralkylové karboxylové kyseliny lze teoreticky metodou GC analyzovat přímo, protože jsou dostatečně těkavé, ale jejich píky jsou značně asymetrické a chvostují v důsledku jejich vysoké polarizace. Proto jsou tyto látky převáděny na těkavější a méně polární deriváty pomocí různých typů derivatizace. Z publikovaných metod lze uvést derivatizaci PFCA na methylestery reakcí s diazomethanem [64,65], methyljodidem [66] a methanolickým roztokem  $\text{BF}_3$  [15]. Alzaga a Bayona [14] publikovali GC-NCI-MS metodu stanovení PFCA využívající tepelný rozklad jejich tetrabutylamoniových solí na SPME vlákne po iontové párové extrakci. Iontové páry PFCA se rozpadají na příslušné butylestery. Výhodou této metody je spojení prekoncentračního a derivatizačního kroku stanovení PFCA. Méně obvyklou metodu derivatizace perfluoralkylových karboxylových kyselin použili Scott a kol. [67,68], kteří převedli PFCA ( $\text{C}_2 - \text{C}_9$ ) působením 2,4-difluoranilinu za přítomnosti *N,N*-dicyklohexylkarbodiimidu na 2,4-difluoranilidy, které následně analyzovali GC-MS. Dále se v této práci autoři zabývají srovnáním metod GC-MS a LC-MS/MS pro analýzu PFOA v kalu torontské čistírky odpadních vod. Koncentrace stanovené oběma metodami jsou téměř identické (GC-MS  $30,9 \text{ ng L}^{-1}$  a LC-MS/MS  $34,7 \text{ ng L}^{-1}$ ). Další publikovanou GC-MS metodou je analýza PFCA derivatizovaných na benzylestery účinkem benzylbromidu v rybích tkáních a říční vodě z Rýna [69]. LOQ metody bylo stanoveno pro PFOA na  $0,2 \text{ ng L}^{-1}$  ve vodných vzorcích a  $0,3 \text{ ng g}^{-1}$  pro vzorky rybích tkání. Koncentrace PFOA v Rýnu (Biebesheim, Německo) byla stanovena na  $2,45 \text{ ng L}^{-1}$ .

V této práci bylo využito derivatizace perfluoralkylových kyselin reakcí s alkylchlormravenčany, konkrétně s chlormravenčanem isobutylnatým. Tato derivatizační metoda byla vyvinuta a optimalizována již v naší předchozí práci [70].

Dle publikací Huška a kol. [71-75] je možno derivatizovat různé druhy kyselin (např. mastné kyseliny, oxokyseliny, aminokyseliny, fenolické kyseliny) na methylestery, ethylestery, butylestery atd. podle druhu činidla – chlormravenčanu. Velkou výhodou této reakce je skutečnost, že ji lze provádět i ve vodném prostředí, takže lze touto metodou přímo derivatizovat vzorky např. plazmy a moči. V reakci je nejprve uhlovodíkový zbytek chlormravenčanu navázán na kyselinu za uvolnění kyseliny chlorovodíkové a vzniku nestabilního anhydridu. Ten se okamžitě rozpadá

(dekarboxyluje) na konečný ester za uvolnění  $\text{CO}_2$ . V reakční směsi je přítomen pyridin jako katalyzátor a někdy příslušný alkohol jako pomocná látka. Reakce probíhá v případě chlormravenčanu isobutylnatého dle následujícího schématu:



kde R je perfluorovaný alkylový řetězec dané kyseliny a vzniklé estery jsou isobutylestery. Při reakci vzniká také v malém množství několik těkavých vedlejších produktů, které zpravidla neruší analýzu [76].

### 2.2.2 Stanovení PFCA metodou HPLC-MS

Nejčastěji používanou metodou pro stanovení perfluorovaných sloučenin ve všech složkách životního prostředí je bezesporu HPLC-MS, či případně HPLC-MS/MS. Výhodou těchto technik je vysoká citlivost a selektivita, ale také to, že se dají perfluoralkylkarboxylové kyseliny měřit přímo, bez nutnosti derivatizace [77-81].

Na rozdíl od ostatních klasických perzistentních kontaminantů (POPs), perfluoralkylové karboxylové kyseliny jsou primárně uvolňovány do vody a akumulují se tudíž v povrchové i podpovrchové vodě. Voda je také hlavní zásobárnou těchto látek v životním prostředí a také hlavním médiem pro jejich transport [13,25,82]. Proto je také velká část publikací věnována této problematice a také naše práce byla zaměřena na tento oddíl životního prostředí. Zde je vybráno několik prací zabývajících se stanovením koncentrace perfluoralkylkarboxylových kyselin v povrchových i podzemních vodách.

34 různých organických kontaminantů, zahrnujících především PFCA ( $\text{C}_7 - \text{C}_{12}$ ) bylo sledováno ve vzorcích vody odebraných podél celé délky toku Dunaje metodou SPE-HPLC-MS/MS. Nejvyšší koncentrace byly nalezeny u PFOA, a to  $46 \text{ ng L}^{-1}$ , průměrná hodnota PFOA pak byla  $20 \text{ ng L}^{-1}$  [83]. Stejní autoři se dále zaměřili na celoevropský průzkum výskytu vybraných perfluorovaných látek ve 164 vzorcích podzemních vod získaných z celkem 23 evropských zemí. PFOA byla nalezena v 66 % vzorků s maximální koncentrací  $39 \text{ ng L}^{-1}$  a PFHpA ve 30 % vzorků s nejvyšší koncentrací  $21 \text{ ng L}^{-1}$  [84].

C<sub>7</sub> – C<sub>11</sub> PFCA a PFOS byly stanoveny ve vybraných úsecích řeky Pád (Itálie) a jejích hlavních přítocích [25]. Nejvyšší koncentrace byly zaznamenány u PFOA, 1300 ng L<sup>-1</sup>, v řece Tánaro poblíž města Alessandra. V ústí řeky do Jaderského moře byla nalezena míra kontaminace PFOA v rozmezí 60 – 174 ng L<sup>-1</sup>.

Ahrens a kol. [85] sledovali koncentraci polyfluorovaných sloučenin, mezi nimi i PFCA (C<sub>4</sub> – C<sub>12</sub>), podél toku Labe v Německu a v Severním moři. Perfluoralkylkarboxylovým kyselinám dominovala PFOA s koncentrací 2,9 – 12,5 ng L<sup>-1</sup>.

Clara a kol. [86] se zabývali výskytem perfluoralkylovaných kyselin (C<sub>6</sub> – C<sub>12</sub>) v rakouském hydrologickém systému. Nejvyšší koncentrace PFOA v povrchové vodě byla 21 ng L<sup>-1</sup>. Dále byl zkoumán sediment 7 alpských jezer a sediment z řeky Dunaje. Ve všech vzorcích dunajského sedimentu byly nalezeny PFHxA, PFHpA a PFOA v rozmezí koncentrací 0,1 – 5,1 ng g<sup>-1</sup> suché váhy.

40 polyfluoralkylovaných chemikálií, včetně PFCA, bylo sledováno ve vodě řeky Rýn podél jeho toku od Bodamského jezera až po ústí do Severního moře. Dominantní perfluoralkylkarboxylovou kyselinou byla PFBA s koncentrací dosahující až 335 ng L<sup>-1</sup> [87].

Nakayama a kol. [88] aplikovali SPE-UPLC-MS/MS pro monitorování PFCA (C<sub>4</sub> – C<sub>12</sub>) ve spádové oblasti povodí řeky Mississippi. Nejvyšší koncentrace byly nalezeny u PFBA, 458 ng L<sup>-1</sup>, a dalším významným kontaminantem byla PFOA s nejvyšší nalezenou koncentrací 125 ng L<sup>-1</sup>.

HPLC-MS/MS metodu stanovení perfluoralkylových kyselin (C<sub>7</sub> – C<sub>11</sub>) bez prekoncentračního kroku ve vzorcích vody z Velkých jezer v USA publikoval Furdui a kol. [89]. PFOA byla nalezena ve všech Velkých jezerech s minimální koncentrací 10 ng L<sup>-1</sup> a nejvyšší koncentrace PFOA byly zjištěny v Ontarijském jezeře poblíž ústí z čističky odpadních vod.

Vzorky mořské vody ze zálivu Guanabara v Jižní Americe obsahovaly PFOA v koncentračním rozmezí 0,7 – 3,25 ng L<sup>-1</sup> [90].

Vzorky povrchové i pitné vody z několika čínských regionů byly měřeny metodou SPE-HPLC-MS/MS [91]. Byly stanovovány dva hlavní perfluorované polutanty – PFOA a PFOS, přičemž se mediány koncentrací (maxima koncentrací) PFOA



ve vzorcích povrchové vody pohybovaly mezi 0,3 (1,3) ng L<sup>-1</sup> pro venkov (n = 13) a 3,9 (30,8) ng L<sup>-1</sup> pro průmyslové oblasti (n = 22).

Kunachevová a kol. sledovali výskyt PFOA a PFOS v thajských řekách protékajících průmyslovými oblastmi [92]. Průměrná koncentrace PFOA byla stanovena metodou SPE-HPLC-MS/MS na 4,7 ng L<sup>-1</sup>.

V Indii byl proveden výzkum zaměřený na stanovení perfluorovaných látek ve vodách řek, jezer, pobřežní mořské a kanalizační vody [93]. Nejvyšší koncentrace PFOA, 23,1 ng L<sup>-1</sup>, byla nalezena v řece Cooum v Chennai. PFOA byla přítomna v 55 %, PFHxA ve 43 % a PFNA ve 40 % všech vzorků. Ve vzorcích nebyla nalezena žádná z kyselin s dlouhým perfluorovaným řetězcem (C<sub>11</sub> – C<sub>14</sub>).

Stanovení perfluoralkylsulfonátů, fluorotelomerních sulfonátů, perfluoralkylových karboxylových kyselin a některých fluorovaných alkylsulfonamidů bylo předmětem studie Schulzové a kol. [94]. Jejich cílem bylo vyvinout jednoduchou a citlivou analytickou metodu pro stanovení fluorovaných chemikálií v odpadní vodě z městských čistíček odpadních vod v USA. Ke stanovení zmíněných sloučenin byla použita HPLC-ESI-MS/MS s velkým objemovým nástřikem (large volume injection), tedy bez použití SPE techniky. PFHxA, PFHpA, PFOA byly detekovány ve všech deseti čistíčkách, na rozdíl od PFNA a PFDA, které byly detekovány pouze v některých. Přítomnost perfluoroktansulfonamidu (PFOSA) na výstupu z čistíček je důkazem toho, že PFOSA vzniká biodegradací fluorovaných prekurzorů vstupujících do čistíček odpadních vod.

Kromě vod byly PFCA také nalezeny v dalších matricích, např. v lidském séru, v mateřském mléce [11, 95-97] či ve tkáních živých organismů pocházejících ze všech částí světa, nevyjímaje Arktidu [98,99]. V tabulce 3 je zpracována rešerše sledovaných perfluoralkylkarboxylových kyselin v nejrůznějších matricích.

Tabulka 3 – Rešeršní tabulka vybraných PFCA sledovaných v různých maticích

<i>Sledované</i> <b>PFCA</b>	<i>Matrice</i>	<i>nalezené koncentrace</i> <b>PFOA</b>	<i>jednotky</i>	<i>metoda</i>	<i>práce</i>
C <sub>7</sub> – C <sub>12</sub>	Říční voda Dunaje + přítoky (Evropská studie)	2 – 46	ng L <sup>-1</sup>	SPE-HPLC-MS/MS	83
C <sub>7</sub> – C <sub>11</sub>	Říční voda Pádu + přítoky (Itálie)	1 – 1300	ng L <sup>-1</sup>	SPE-HPLC-MS/MS	25
C <sub>4</sub> – C <sub>12</sub>	Říční voda Labe + Severní moře (Německo)	2,9 – 12,5	ng L <sup>-1</sup>	SPE-HPLC-MS/MS	85
C <sub>8</sub>	Říční voda Roter Main (Německo)	2,2 – 14	ng L <sup>-1</sup>	SPE-HPLC-MS/MS	37
C <sub>6</sub> – C <sub>12</sub>	Alpská jezera, Dunaj (Rakousko)	1,1 – 21	ng L <sup>-1</sup>	LLE-HPLC-MS/MS	86
C <sub>4</sub> – C <sub>12</sub>	Říční voda Mississippi (USA)	16,3 – 125	ng L <sup>-1</sup>	SPE-UPLC-MS/MS	88
C <sub>4</sub> – C <sub>12</sub>	Velká jezera (USA)	1,3 – 38,1	ng L <sup>-1</sup>	HPLC-MS/MS (bez prekonc.)	89
C <sub>8</sub>	Povrchová voda (Thajsko)	0,7 – 64,3	ng L <sup>-1</sup>	SPE-HPLC-MS/MS	92
C <sub>7</sub> – C <sub>12</sub>	Povrchová voda + Atlantický oceán (Brazílie)	0,7 – 3,25	ng L <sup>-1</sup>	SPE-HPLC-MS/MS	90
C <sub>8</sub>	Povrchová voda (Čína)	0,3 – 30,8	ng L <sup>-1</sup>	SPE-HPLC-MS/MS	91
C <sub>3</sub> – C <sub>14</sub>	Povrchová voda (Indie)	1 – 23,1	ng L <sup>-1</sup>	SPE-HPLC-MS/MS	93
C <sub>8</sub>	Pitná voda (severní Itálie)	1,0 – 2,9	ng L <sup>-1</sup>	SPE-HPLC-MS/MS	100
C <sub>5</sub> , C <sub>7</sub> a C <sub>8</sub>	Pitná voda - kontaminace (Arnsberg, Německo)	500 – 640	ng L <sup>-1</sup>	SPE-HPLC-MS/MS	101
C <sub>8</sub>	Pitná voda (Osaka, Japonsko)	2,3 – 84	ng L <sup>-1</sup>	SPE-HPLC-MS/MS	102
C <sub>6</sub> – C <sub>12</sub>	Sediment z Dunaje (Rakousko)	0,1 – 5,1	ng g <sup>-1</sup>	SLE-HPLC-MS/MS	86
C <sub>7</sub> – C <sub>10</sub>	Mořský sediment (Barcelona, Španělsko)	0,8 – 12	ng g <sup>-1</sup>	SPME-GC-MS	15
C <sub>8</sub>	Lidské sérum - celosvětový průzkum	1 – 256	μg L <sup>-1</sup>	IPE-HPLC-MS/MS	95
C <sub>8</sub>	Plasma matek a novorozenců (Německo)	1,5 – 4,6	μg L <sup>-1</sup>	LLE-HPLC-MS/MS	96
C <sub>6</sub> – C <sub>12</sub>	Mateřské mléko (Švédsko)	7 – 30	ng L <sup>-1</sup>	SPE-HPLC-MS/MS	97
C <sub>8</sub> – C <sub>14</sub>	Játra polárních medvědů, lišek a ryb (Kanada)	2 – 13	ng g <sup>-1</sup>	IPE-HPLC-MS/MS	99

### 2.2.3 Stanovení PFCA metodou kapilární zónové elektroforézy

Skupina polských vědců se zabývala stanovením  $C_6$  až  $C_{12}$  aniontů perfluoralkylkarboxylových kyselin pomocí CZE s nepřímou UV detekcí ve vodných vzorcích [103]. Nosným elektrolytem byl 50 mM tris(hydroxymethyl)aminomethan a 50 % methanol a jako chromofor byla použita 2,4-dinitrobenzoová kyselina. Detekční limit pro stanovované látky se pohyboval mezi 0,6 a 2,4 mg L<sup>-1</sup>. Dále také publikovali metodu přímé UV detekce (při vlnové délce 190 nm), kde byl použit 50 mM fosfátový pufr se 40 % isopropanolem jako nosným elektrolytem. Dosažené limity detekce byly stanoveny mezi 2 – 22 mg L<sup>-1</sup> [104]. Další publikovanou prací této skupiny je stanovení PFCA na CE čipu s vodivostní detekcí v prostředí nosného elektrolytu obsahujícího směs vody a ethanolu [105]. Byly dosaženy limity detekce pro stejné analyty jako v předchozích dvou pracích v rozmezí 0,3 – 6,5 μmol L<sup>-1</sup>. Jak je patrné, metody kapilární elektroforézy s různými typy detekce zatím nedosahují takové citlivosti, jako již prověřené GC a HPLC techniky.

### 2.2.4 Používané extrakční metody pro stanovení PFC ve vzorcích životního prostředí

Mezi nejběžněji používané metody pro zakoncentrování a přečištění reálných vzorků, jak vodných vzorků, tak i biologických matric, patří extrakce a mikroextrakce na tuhé fázi. Dále se používá i iontově-párová extrakce či jednoduchá extrakce kapalinou.

#### 2.2.4.1 Extrakce na tuhé fázi

Jako prekoncentrační krok pro různé druhy reálných vzorků, jako je například povrchová či odpadní voda, sediment, kal z čističek odpadních vod, ale i biologické matrice, je velmi často užívána extrakce na tuhé fázi, následovaná většinou HPLC-MS. Weremiuková a kol. [37] se zabývali kvantitativním stanovením PFOA a PFOS ve vodných vzorcích právě pomocí těchto spojených metod. Pro SPE extrakci byly vybrány kolonky Oasis HLB Waters (6 mL, 200 mg), které jsou pro tyto typy analytů velmi často používané i v dalších publikovaných pracích. Vzorky byly odebrány na čtyřech různých místech řeky Roter Main v Německu, nad a pod čističkou odpadních vod. Nejvyšší koncentrace obou stanovovaných chemikálií byly zaznamenány 100 m

pod čističkou ( $14 \text{ ng L}^{-1}$  PFOA a  $26 \text{ ng L}^{-1}$  PFOS). Dále po proudu řeky 1 km od čističky se již koncentrace snížily na  $12 \text{ ng L}^{-1}$  a  $14,5 \text{ ng L}^{-1}$ . Nad čističkou odpadních vod byly koncentrace mnohem nižší. Znamená to tedy, že velký podíl na kontaminaci řek perfluorovanými polutanty má městská odpadní voda.

Stanovením perfluoralkylkarboxylových kyselin  $C_8 - C_{14}$ , PFOS a PFDS se zabýval Higgins a kol. [106]. Jako vhodnou analytickou metodu pro jejich detekci a přesnou kvantifikaci v sedimentech a odpadní vodě si vybrali HPLC-MS/MS s prekoncentračním krokem SPE ( $C_{18}$  kolonky, 500 mg, Alltech). V březnu 2004 byly shromážděny vzorky sedimentů, odebrané 1 až 5 cm pod povrchem, z ústí řek a zálivů v okolí San Francisca. Další sedimenty z Palo Alto Medflats, Haywardu, Baltimoru a Corvallis byly odebrány od dubna 2002 do června 2004. Vzorky kalu z osmi čističek odpadních vod a usazené pevné látky z dalších tří čističek byly shromážděny od února 1998 do června 2004. Celková koncentrace PFCA v odpadní vodě se pohybovala v rozmezí  $73 - 3390 \text{ ng g}^{-1}$ . Koncentrace v sedimentech byly na rozdíl od odpadní vody nižší, a to v rozmezí  $0,14 - 16,0 \text{ ng g}^{-1}$ .

#### **2.2.4.2 Mikroextrakce na tuhé fázi**

Saito a kol. [26] vyvinuli SPME metodu spojenou s HPLC-MS, pomocí které stanovovali PFOA a PFOS. Jedná se o on-line metodu, kde je využito GC kapilární kolony (CP-Pora PLOT) jako mikroextrakční kolonky, zařazené mezi nástřikovou smyčku a jehlu autosampleru. Dosáhli tak stonásobně vyšší citlivosti, než při přímém nástřiku, LOD pro PFOA bylo stanoveno na  $1,5 \text{ ng L}^{-1}$ , pro PFOS pak  $3,2 \text{ ng L}^{-1}$ . Touto metodou pak stanovili PFOA a PFOS ve vodných vzorcích Japonska a také v eluátu z teflonové pánve. Nejvyšší koncentrace byly zaznamenány v Osace, kde v pitné vodě z vodovodu byly zaznamenány koncentrace PFOA  $35,3 \text{ ng L}^{-1}$  a v eluátu z teflonové pánve  $27,3 \text{ ng L}^{-1}$ . PFOS nebyl detekován v žádném z měřených vzorků.

Stanovením perfluorovaných látek ve vodě a sedimentu pomocí SPME následovanou GC-NCI-MS se zabývali Alzaga a Bayona [15,16]. PFCA byly zkoumány v různých matricích, jako jsou povrchová voda, podzemní voda, biologický materiál a derivatizovány na příslušné metyl- a butylestery přímo na SPME vlákne v nástřikovém prostoru. Vysoká selektivita a účinnost této analytické metody byla zjištěna u butylesteru kyseliny perfluorhexanové. PFOA a PFDA byly detekovány ve vzorcích

odpadní vody a jejich koncentrace se pohybovala v rozmezí od 0,34 do 4,32  $\mu\text{g L}^{-1}$  pro PFOA a od 0,5 do 8,2  $\mu\text{g L}^{-1}$  pro PFDA. Použitá metoda byla označena za spolehlivou, citlivou a selektivní techniku pro stanovení PFCA ve vzorcích vodného prostředí.

#### 2.2.4.3 Iontově-párová extrakce

Stanovením koncentrace PFHxS, PFOS, PFOA v játrech ptáků se zabýval Kannan a kol. [38]. Pro měření byla využita metoda HPLC-ESI-MS/MS, kde jako prekoncentrační krok byla provedena iontově-párová extrakce za pomoci tetrabutylamoniumhydrogensulfátu. Ptáci byli odchyceni z průmyslových oblastí kolem velkých měst Tokya a Yokohamy a z chovné stanice Gytoku (Japonsko) a dále v blízkosti řeky Sagami (Japonsko) a Nakdong (Jižní Korea), které se nacházejí v blízkosti továren a rafinerií (celkem 83 ptáků šesti různých druhů). PFOS byl nalezen v játrech 95 % všech ptáků a jeho koncentrace se pohybovala nad mezí stanovitelnosti, která odpovídá 19 ng  $\text{g}^{-1}$  čerstvé tkáně. Nejvyšší naměřená koncentrace 650 ng  $\text{g}^{-1}$  PFOS byla zaznamenána u kormorána obecného (*Phalacrocorax carbo*), který žil u řeky Sagami. U ptáků z Japonska byly nalezené koncentrace obecně vyšší, než u korejských ptáků. PFOA a PFHxS byly nalezeny u 5 až 10 % vzorků, nejvyšší koncentrace odpovídaly 21 ng  $\text{g}^{-1}$  resp. 34 ng  $\text{g}^{-1}$ . Výsledky této studie poukazují na velmi rozšířený výskyt především PFOS v životním prostředí a jsou řádově srovnatelné s podobnými studiemi provedenými v Evropě a Spojených Státech.

Několik různých extrakčních technik pro prekoncentraci a stanovení  $\text{C}_4 - \text{C}_{12}$  PFCA v půdách použil a srovnal Washington a kol. [78]. Konkrétně porovnával iontově-párovou extrakci s použitím tetrabutylamoniumhydrogensulfátu, jednoduchou extrakci tuhé látky kapalinou s použitím směsi acetonitril/voda a SPE metody s různými stacionárními fázemi. Byl nalezen tento optimální postup přípravy a přečištění vzorku: prvotní extrakce půdy směsí acetonitril/voda, odpaření, následné rozpuštění v roztoku tetrabutylamoniumhydrogensulfátu, dále pak extrakce iontového páru do methyl-*tert*-butyletheru, další odpaření a finální rozpuštění vzorku ve směsi (acetonitril/voda, 60:40 v/v) pro měření pomocí HPLC-MS/MS. Ve všech třech testovaných vzorcích půdy byly touto technikou detekovány všechny testované perfluoralkylkarboxylové kyseliny  $\text{C}_6 -$

C<sub>10</sub>. Nejnižší koncentrace přibližně 30 pg g<sup>-1</sup> v suchém vzorku zemědělských půd byla stanovena pro PFHxA a PFDA.

Stanovení koncentrace PFHxS, PFOS, PFOA a PFOSA v lidské krvi bylo cílem i další studie, kterou zpracoval Hansen a kol. [107]. Provedl kvantitativní analýzu 65 vzorků lidského séra odebraného od dárců ve Spojených Státech, kteří nebyli vystaveni přímé expozici z průmyslové výroby. Pro měření byla využita již zmíněná metoda HPLC-ESI-MS/MS a jako prekoncentrační krok byla provedena iontově-párová extrakce tetrabutylamoniovou solí. PFOS se vyskytl v nejvyšší koncentraci, která odpovídala 28,4 µg L<sup>-1</sup> (tj. 18,4 µg L<sup>-1</sup> organický vázaného fluoru). Ostatní stanovované látky byly nalezeny v mnohem nižších koncentracích. Celkové množství organicky vázaného fluoru bylo stanoveno na 27 µg L<sup>-1</sup> krevního séra.

## 2.3 Charakterizace interakcí analytu se stacionární fází v plynové chromatografii

V této práci je část věnována i studiu termodynamických vlastností perfluoralkylkarboxylových kyselin a jejich chování v chromatografickém systému. Proto je zde uvedena stručná teorie termodynamiky i se vzorci, které byly použity při výpočtech.

Na retenci, neboli zadržování, mají v plynové chromatografii největší vliv povrchové a vnitřní (bulk) interakce analytu se stacionární fází. Tyto interakce jsou charakterizovány retenčními parametry, jako je specifický retenční objem  $V_g$ , který je závislý na druhu analytu, stacionární fází a nosném plynu.  $V_g$  lze snadno vztáhnout k termodynamickým veličinám, které jsou detailně popsány v literatuře [108,109]. Specifický retenční objem v jednotkách mL g<sup>-1</sup> lze vypočítat z experimentálně zjištěných dat pomocí vztahu:

$$V_g = (t_R - t_M) j_{mn} F \frac{273,15}{w T_C} \quad (1)$$

kde  $t_R$  (min) je retenční čas rozpuštěné látky, tedy analytu a  $t_M$  (min) je mrtvý čas inertní látky, například methanu nebo vzduchu.  $T_C$  (K) je teplota kolony,  $F$  (mL min<sup>-1</sup>) je průtoková rychlost nosného plynu měřená při teplotě  $T_C$ ,  $w$  (g) je hmotnost stacionární fáze v koloně a  $j_{mn}$  je kompresibilitní faktor, který závisí na vstupním tlaku  $p_i$  (Pa) a výstupním tlaku  $p_o$  (Pa).  $j_{mn}$  lze vypočítat z následujícího vztahu [110]:

$$j_{mn} = \frac{m}{n} \left[ \frac{(p_i/p_0)^n - 1}{(p_i/p_0)^m - 1} \right] \quad (2)$$

K výpočtu  $j_{mn}$  jsou běžně používány hodnoty  $m = 3$  a  $n = 2$  s dostatečně velkou přesností.

Pokud je stacionární fáze v kondenzovaném stavu, tedy kapalná či tuhá, lze vynést logaritmus specifického retenčního objemu proti reciproké hodnotě teploty  $T_c$ . Pro teplotní rozmezí, kde se tepelná kapacita rozpuštěné látky téměř nemění, dostáváme lineární přímku. Sklon přímky určuje parciální molární entalpii  $\Delta H$  ( $\text{J mol}^{-1}$ ), což lze vyjádřit následujícím vztahem:

$$\ln V_g = \frac{\Delta H}{RT_c} + C \quad (3)$$

kde  $R$  je plynová konstanta,  $T_c$  je teplota kolony a  $C$  je integrační konstanta.

Parciální molární Gibbsova energie rozpouštění  $\Delta G$  ( $\text{J mol}^{-1}$ ) je pro rozpuštěné látky v termodynamické rovnováze v systému nosný plyn – stacionární fáze dána vztahem:

$$\Delta G^0 = \mu_{is}^0 - \mu_{im}^0 = -RT \ln \left( \frac{f_{is}/f_{is}^0}{f_{im}/f_{im}^0} \right) \quad (4)$$

kde  $\mu_{is}^0$  a  $\mu_{im}^0$  jsou standardní chemické potenciály rozpuštěné látky ve stacionární ( $s$ ) a mobilní fázi ( $m$ ),  $f_{is}$  a  $f_{im}$  jsou odpovídající fugacity a  $f_{is}^0$  a  $f_{im}^0$  jsou fugacity rozpuštěné látky ve standardním stavu [111].

Podmínka rovnováhy je přibližně platná pouze pro střed chromatografické zóny, proto jsou tedy chromatografická data získávaná z maxima příslušných píků.

Pokud bychom chtěli počítat  $\Delta G$  z experimentálně získaných parametrů, je nutné si nejprve definovat standardní stavy rozpuštěné látky v obou fázích [112]. Zde lze využít: (a) definice koncentračních jednotek, (b) definice standardních koncentrací rozpuštěné látky v obou fázích a (c) normalizaci aktivitních koeficientů rozpuštěné látky v kondenzované fázi. V našem případě můžeme považovat rozpuštěnou látku za nekonečně zředěnou v obou fázích a proto je nejvhodnější vybrat tyto standardní stavy: (a) koncentrace jako molární zlomek ve stacionární fázi  $x_{is}$ , (b) standardní koncentrace rozpuštěné látky ve stacionární fázi  $x_{is}^0 = 1$  a (c) aktivitní koeficient rozpuštěné látky ve stacionární fázi  $\gamma_{is} = 1$  při  $x_{is} \rightarrow 0$ . Pro mobilní fázi je pak (a) koncentrace definována při tlaku  $p^0 = 101325 \text{ Pa}$  jako molární zlomek v mobilní fázi  $x_{im}$  a (b) standardní koncentrace rozpuštěné látky v mobilní fázi  $x_{im}^0 = 1$ .

Pro aktuální a standardní fugacity rozpuštěné látky ve stacionární i mobilní fázi dostáváme:

$$f_{is} = \gamma_{is} h_i x_{is} \quad \text{a} \quad f_{is}^0 = h_i x_{is}^0 = h_i \quad (5a)$$

$$f_{im} = v_{im} p x_{im} \quad \text{a} \quad f_{im}^0 = 1 \quad (5b)$$

kde  $h_i$  je Henryho konstanta rozpuštěné látky,  $v_{im}$  je fugacitní koeficient rozpuštěné látky ve směsi s nosným plynem při teplotě  $T_c$  a tlaku  $p$ . Tímto vyjádřením pak zahrnuje normalizace aktivitního koeficientu odchylky systému od Henryho zákona. Po této specifikaci standardních stavů lze vztah 4 vyjádřit takto:

$$\Delta G = -RT_C \ln \left[ V_g \frac{\gamma_{is} M_s}{273,15 v_{im} z_m R} \right] \quad (6)$$

kde  $M_s$  je relativní molekulová hmotnost stacionární fáze a  $z_m$  je kompresibilitní faktor mobilní fáze [30].

V systému, kde je stacionární fáze chemicky nedefinovatelná, například když  $M_s$  není známá, musí být definice standardních stavů modifikována. Nejlepším a nejjednodušším způsobem je definování koncentrace rozpuštěné látky ve stacionární fázi pomocí molálního zlomku  $m_{is}$ , standardní molality  $m_{is}^0 = 1$  a příslušného molálního aktivitního koeficientu  $\gamma_{is}^m = 1$  při  $m_{is} \rightarrow 0$ . Takto se dá přeformulovat vztah 5a na:

$$f_{is}^m = \gamma_{is}^m l_i m_{is} \quad \text{a} \quad f_{is}^{0m} = l_i \quad (7)$$

kde  $l_i$  je konstanta (podobně jako  $h_i$ ) vztažená k  $f_{is}^m$  a  $m_{is}$  v oblasti nekonečného ředění. Co se týče  $x_{is}$  a  $m_{is}$  při nekonečném ředění, kde  $\gamma_{is} \rightarrow 1$  a  $\gamma_{is}^m \rightarrow 1$ , lze aproximovat [113]:

$$\frac{x_{is}}{m_{is}} \approx \frac{M_s}{1000} \quad (8)$$

Přeformulováním vztahu 6 s podmínkami vyplývajících ze vztahů 7 a 8 můžeme napsat:

$$\Delta G = -RT_C \ln \left[ V_g \frac{\gamma_{is}^m 1000}{273,15 v_{im} z_m R} \right] \quad (9)$$

Pro podmínky nekonečného zředění a malého poklesu tlaku podél kapilární kolony limitují koeficienty  $\gamma_{is}^m$ ,  $v_{im}$  a  $z_m$  k jedné. I když hodnoty  $M_s$  stacionární fáze nejsou dostupné, vztah 9 lze použít i bez této znalosti ke kalkulaci  $\Delta G$  analytů [113].



Pokud známe hodnoty  $\Delta G$  a  $\Delta H$ , lze jednoduše dopočítat parciální molární entropii  $\Delta S$  při teplotě  $T_c$  dle vztahu:

$$\Delta S = - \left( \frac{\partial \Delta G}{\partial T} \right)_p = \frac{(\Delta H - \Delta G)}{T_c} \quad (10)$$

Pokud známe hodnotu specifického retenčního objemu  $V_g$  při teplotě  $T_c$ , můžeme získat distribuční konstantu rozpuštěné látky mezi stacionární a mobilní fází dle následujícího vztahu:

$$K_D = V_g \frac{T_c \rho_{sp}}{273,15} \quad (11)$$

kde  $\rho_{sp}$  ( $\text{g cm}^{-3}$ ) je hustota stacionární fáze (změna hustoty s rostoucí teplotou je zde zanedbána) [114].

Fázový poměr  $\beta$ , vyjadřující poměr objemu mobilní a stacionární fáze kolony, je definován takto:

$$\beta = \frac{d}{4d_f} \quad (12)$$

kde  $d$  je vnitřní průměr kolony a  $d_f$  je tloušťka filmu stacionární fáze. Pouze u kolon se stejným fázovým poměrem a stejnou délkou lze očekávat shodu retenčních časů [114].

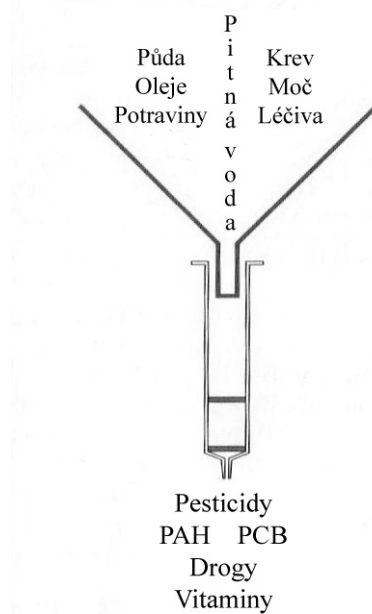
## 2.4 Teorie SPE - extrakce tuhou fází

Tato práce se zabývá vývojem analytických metod, které zahrnují i prekoncentrační krok. V našem případě byla použita k přečištění a zakoncentrování reálných vodných vzorků extrakce na tuhé fázi, tedy SPE. V této kapitole je proto teorie této extrakční metody zmíněna.

Extrakce na tuhé fázi je metoda, při které dochází k rozdělení analytu mezi dvě nemísitelné fáze, z nichž jedna je tuhá. Tuhou fází je analyt zachytáván z plynné nebo kapalně fáze [114]. Ostatní látky ze vzorku se sorbují velmi málo nebo vůbec, čím dochází zároveň i k přečištění vzorku od matrice. Metoda je často využívána k odběru a úpravě vzorků ve spojení se separačními metodami. Umožňuje vzorkovat velké objemy a zároveň selektivně zkoncentruje vybraný analyt, čímž ale změní složení vzorku.

Díky stále se zvětšující nabídce komerčních produktů (kolonek, disků...) a výhodám (rychlost, selektivita, reprodukovatelnost, citlivost a možnost automatizace), se SPE ve spojení s plynovou nebo kapalinovou chromatografií využívá v analýze složek

životního prostředí, ve farmacii, klinické praxi, toxikologii nebo v potravinářství.



Obrázek 2.2 – Schematická ukázka využití extrakce na tuhé fázi [115]

Celý proces SPE může být rozdělen na několik dílčích kroků:

- 1) Výběr vhodné tuhé fáze (sorbentu), a to jak typu, tak velikosti kolonky dle druhu analytu a objemu vzorku. Před volbou tuhé fáze je třeba zjistit co nejvíce informací o vzorku a na základě těchto informací potom vybrat vhodný typ fáze a velikost kolonky. Různé vlastnosti, určující mechanismus sorpce na tuhé fázi (adsorpce, rozpouštění, afinita, iontová výměna nebo molekulové rozpoznávání), dovolují různé experimentální uspořádání (terče, kolonky, vlákna), čímž se metoda stává velmi variabilní.
- 2) Prvním krokem samotné práce je kondicionace kolonky, při které dochází k solvataci stacionární fáze. Ta se propláchne předepsanými roztoky rozpouštědel, které jsou určeny složením stacionární fáze a poté roztokem podobným vzorku. Tím je umožněn samotný záchyt hledaného analytu.
- 3) Dalším krokem je samotné nadávkování vzorku, při kterém dojde ke specifickým interakcím mezi tuhous fází kolonky a látkami ve vzorku. Hledaný analyt se zadržuje, zatímco matrice projde bez záchytu.
- 4) Následné promytí kolonky vhodným činidlem vede k vymytí nežádoucích zbytků matrice, tento krok může být ale přeskočen, pokud by hrozilo nežádoucí vymytí analytu.
- 5) Předposledním krokem může být sušení, které se provádí buď inertním plynem (N<sub>2</sub>)

nebo vzduchem, a to jen v případě, že je eluční činidlo nekompatibilní s rozpouštědlem vzorku.

6) Posledním krokem je eluce rozpouštědlem, při kterém dochází k uvolnění zachyceného analytu. Aby bylo dosaženo co největšího zakoncentrování, vzorek se desorbuje do co nejmenšího objemu. Analyt může být také uvolněn termicky, kdy dochází k uvolnění zachyceného analytu do proudu plynné fáze zvýšením teploty [114].

Existuje celá řada dostupných stacionárních fází. Mezi nejběžněji používané fáze patří C18 – oktadecyl vázaný na křemíkový atom silikagelu, používaný hlavně pro nepolární až středně polární analyty. Pro analyty nesoucí náboj je možno použít iontově výměnné tuhé fáze. Záchyt analytu se uskutečňuje převážně díky vzájemným elektrostatickým interakcím mezi nabitými funkčními skupinami analytu a tuhé fáze. Podle náboje skupiny se dělí na kation- nebo anion-výměnné. SAX (strong anion exchanger) je nejčastěji polymerně vázaný kvartérní amin, běžně používaný k záchytu aniontů, nukleových kyselin, nukleotidů a organických kyselin.

SCX (strong cation exchanger) je nejčastěji na silikagel navázaná benzensulfonová kyselina, která se používá na záchyt kationických antibiotik, herbicidů a dalších organických látek. Iontově výměnné fáze zahrnují i další typy včetně slabých analogů k SAX a SCX s označením W (weak).

V našem případě byla vybrána tuhá fáze z hydrofilně modifikovaného polymeru na bázi styrenu s komerčním názvem Supel<sup>TM</sup>-Select HLB (6 mL, 200 mg, Supelco), který je používaný pro záchyt široké škály látek z vodného prostředí. Díky hydrofilní úpravě fáze lze zachytávat i polární sloučeniny. Organické analyty ve vzorcích se v kolonce zachytávají díky nepolárním interakcím, například van der Waalsovým či disperzním interakcím, a funkčním skupinám na povrchu pevné fáze. K eluci sorbovaného analytu se pak použije rozpouštědlo, které naruší vzájemné interakce mezi analytem a tuhou fází [116]. Naše analyty, tedy perfluoralkylkarboxylové kyseliny, byly zachytávány na této tuhé fázi v podobě iontového páru, který se vytvoří z molekul PFCA a tetrabutylamoniumbromidu (viz podrobněji v kapitole 4.2.2.4).

Co se týče velikosti vybraných kolonek, objem 6 mL je největší pro tuto stacionární fázi a je pak vhodný pro velké objemy vodných vzorků řádově o objemu stovek mililitrů až jednoho litru.

## 2.5 Metody určení LOD a LOQ

Pro správné vyjádření citlivosti měřicího zařízení či metody je potřeba zvolit nejvhodnější postup určení limitů detekce a stanovitelnosti.

Signál měřicího zařízení  $S$  je tvořen příspěvkem analytu, matrice vzorku a instrumentace GC. Pro účely kvantitativní analýzy musí platit, že signál analytu  $S_i$  je přímo úměrný koncentraci analytu  $c_i$  a citlivosti měřicího zařízení. Citlivost je vyjádřena jako součin konstrukčních vlastností  $K$  měřicího zařízení a specifických vlastností analytu  $a_i$ . Nezbytnou podmínkou správné kalibrace měřicího zařízení je neměnnost jeho citlivosti v použitém koncentračním intervalu analytu. Vztah mezi signálem, citlivostí, linearitou a koncentrací analytu lze pak vyjádřit obecným vztahem:

$$S_i = (Ka_i) c_i^l \quad (13)$$

V případě hodnoty koeficientu linearit  $l$  blízkému jedné mohou být mez detekce a mez stanovitelnosti vypočítány ze společné směrodatné odchylky regrese  $SDR$  (odpovídá hodnotě  $SD$  lineární regrese v anglické verzi programu Origin) tak, že pro  $LOD$  je brána hodnota  $3 \times SDR$  a pro  $LOQ$  hodnota  $10 \times SDR$ . Dosadíme-li za nejmenší signál trojnásobek  $SDR$  a za koncentraci  $LOD$  do rovnice 13, pak pro  $l \sim 1$  dostaneme:

$$LOD = \frac{3SDR}{(Ka_i)} \quad (14)$$

Obdobně, dosadíme-li za nejmenší signál pro kvantifikaci desetinásobek  $SDR$  a za koncentraci  $LOQ$  do rovnice 13, pak pro  $l \sim 1$  dostaneme:

$$LOQ = \frac{10SDR}{(Ka_i)} \quad (15)$$

Pokud se linearita výrazněji odchylují od jedné, je nutné přejít k výpočtu  $LOD$  a  $LOQ$  z logaritmické závislosti plochy píku na koncentraci dle vztahu:

$$\log S_i = \log(Ka_i) + l \log c_i \quad (16)$$

Pak je za hodnotu signálu dosazeno  $3 \times SDR$  pro  $LOD$  a  $10 \times SDR$  pro  $LOQ$ . Po úpravě dostáváme vztahy pro výpočet  $LOD$  (17) a  $LOQ$  (18) [115,117,118]:

$$LOD = \sqrt[l]{\frac{3SDR}{Ka_i}} \quad (17)$$

$$LOQ = \sqrt[l]{\frac{10SDR}{Ka_i}} \quad (18)$$

Pro některé měřicí přístroje je vhodnější počítat  $LOD$  a  $LOQ$  z naměřeného poměru signál/šum ( $S/N$ ), kdy bývá tento výpočet přesnější, než výpočet ze směrodatné odchylky regrese. V separačních metodách se mez detekce vyjadřuje jako trojnásobek šumu základní linie a mez stanovitelnosti jako desetinásobek šumu základní linie. Modernější přístroje většinou umí tento poměr pro jednotlivé píky rovnou vypočítat. Limit detekce se pak počítá z nejnižšího bodu kalibrace jednoduchou trojčlenkou tak, že vynásobíme odpovídající koncentraci třemi a vydělíme jí poměrem  $S/N$  (19).  $LOQ$  se pak počítá obdobně, jen je koncentrace vynásobená desíti (20).

$$LOD = \frac{3c}{S/N} \quad (19)$$

$$LOQ = \frac{10c}{S/N} \quad (20)$$

### 3. Experimentální část

#### 3.1 Standardy a chemikálie

Použity byly tyto standardy: kyselina perfluorpentanová (97%, Aldrich, Steinheim, Německo), kyselina perfluorhexanová (95%, Fluka, Steinheim, Germany), kyselina perfluorheptanová (95%), kyselina perfluoroktanová (95%), kyselina perfluornonanová (97%), kyselina perfluordekanová (98%), kyselina perfluorundekanová (95%), kyselina perfluordodekanová (95%), kyselina perfluortridekanová (97%), kyselina perfluortetradekanová (97%), kyselina oktanová (98%, všechny Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Použitými chemikáliemi byl hexan (99%, Baker Analyzed, Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holandsko), acetonitril (p.a., Lichrosolv, Darmstadt, Německo), methanol (> 99,9%, Rotisolv HPLC, Carl Roth, Karlsruhe, Německo), kyselina fosforečná, isobutylalkohol, octan amonný, hydroxid sodný, uhličitán sodný (všechny p.a., Penta, Chrudim, Česká republika), tetrabutylamoniumbromid (>98%, Fluka, Steinheim, Německo), pyridin (99%), chlormravenčan isobutylnatý (98%, oba Aldrich, Steinheim, Německo) a voda (Milli-Q Plus, Millipore).

Při analýzách na CE-MS byly používány tyto chemikálie: mravenčan amonný (97 % p.a., Alfa Aesar, Karlsruhe, Německo), octan amonný (97 %, p.a. Carl Roth, Karlsruhe, Německo), kyselina mravenčí (98 – 100 %, p.a.), kyselina octová (100 %, p.a. obě Merck, Darmstadt, Německo), kofein (99 %, Avocado Research Chemicals, Heysham, Velká Británie), isopropanol (99,95 %, Rotisolv HPLC, Carl Roth, Karlsruhe, Německo), methanol (LiChrosolv HPLC), acetonitril (LiChrosolv HPLC) a amoniak (roztok 25 %, p.a., Merck, Darmstadt, Německo).

#### 3.2 Přístrojové vybavení

##### GC a GC-MS

Analýzy byly prováděny na plynovém chromatografu PU 4600, (Unicam Analytical Systems, Cambridge, Velká Británie) s plamenově ionizačním detektorem (FID) a detektorem elektronového záchytu (ECD). Nosným plynem byl dusík (99,997%, Linde Technoplyn). Pro měření byly využity tyto kapilární kolony: SPB-1 (Supelco, Bellefonte, USA, 30 m, 0,25 ID, film 0,25  $\mu$ m, dimethylpolysiloxan), SPB-5 (Supelco,

15 m, 0,25 ID, film 0,25  $\mu\text{m}$ , 5 % difenyl, 95 % dimethylpolysiloxan), SPB-20 (Supelco, 15 m, 0,25 ID, film 1  $\mu\text{m}$ , 20 % difenyl, 80 % dimethylpolysiloxan), SPB-35 (Supelco, 30 m, 0,25 ID, film 1  $\mu\text{m}$ , 35 % difenyl, 65 % dimethylpolysiloxan), ZB-1701 (Phenomenex, Torrance, USA, 15m, 0,25 ID, film 0,25  $\mu\text{m}$ , 14 % kyanopropylfenyl, 86 % dimethylpolysiloxan), Supelcowax 10 (Supelco, 30 m, 0,25 ID, film 0,25  $\mu\text{m}$ , polyethylenglykol), SP-2340 (Supelco, 30 m, 0,32 ID, film 0,2  $\mu\text{m}$ , 100 % poly(bis-kyanopropylsiloxan), SLB IL-100 (Supelco, 30 m, 0,25 ID, film 0,2  $\mu\text{m}$ , 1,9-di(3-vinylimidazolium)nonan-bis(trifluoromethyl)sulfonylimidát), Rtx-200MS (Restek, Bellefonte, USA, 30 m, 0,25 ID, film 0,25  $\mu\text{m}$ , trifluorpropylmethylpolysiloxan).

Sběr dat a zpracování výsledků bylo provedeno v programu CSW 1.7 (DataApex s.r.o., Jinonice, Česká Republika).

Dále bylo měřeno na plynovém chromatografu s hmotnostním spektrometrem GCMS-QP5050A, Shimadzu (Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japonsko) s kolonou DB-5MS (Agilent Technologies, USA) délky 30 m o vnitřním průměru 0,25 mm a tloušťce filmu 0,25  $\mu\text{m}$  (5 % difenyl, 95 % dimethylpolysiloxan). Nosným plynem bylo helium (99,999 %, Linde). K dispozici byl hmotnostní spektrometr s EI ionizací (energie 70 eV). Ke sběru dat sloužil program LabSolution (GCMSsolution 1.2, Shimadzu). K interpretaci hmotnostních spekter byla použita knihovna spekter NIST 05 (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, National Institute of Standards and Technology, USA).

Reálné vzorky byly proměřovány i na nově zakoupeném plynovém chromatografu s hmotnostním detektorem GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu (Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japonsko). Nosným plynem bylo helium (99,999 %, Linde). K dispozici byl hmotnostní spektrometr s negativní chemickou ionizací, reakčním plynem byl methan (99,9995 %, Linde). Používanou kolonou byla již zmíněná RTX-200MS. Ke sběru dat sloužil program LabSolution (GCMSsolution 2.3, Shimadzu).

## **HPLC-MS**

Analýzy HPLC-MS byly provedeny na přístroji Esquire 3000 (hmotnostní detektor s iontovou pastí, Bruker Daltonics, Bremen, Německo). HPLC separace byly prováděny

na koloně s C18 stacionární fází s komerčním názvem Prontosil (200 mm × 2,0 mm ID, 3,0 µm, Bishoff, Leonberg, Německo).

## **CE-MS**

CE-TOF-MS analýzy byly prováděny na microTOF hmotnostním spektrometru s elektrosprejovou ionizací (Bruker Daltonics, Bremen, Německo), spojených s laboratorně zhotovenou kapilární elektroforézou a zdrojem vysokého napětí (model HCN 35000, F.u.G. Elektronik, Rosenheim-Langenpfunzen, Německo). Separace byly prováděny na křemenné kapiláře o délce 28 cm s vnitřním průměrem 25 µm.

CE-qqq-MS/MS analýzy byly prováděny na kapilární elektroforéze (7100, Agilent Technologies) s tandemovým hmotnostním detektorem s trojitým kvadrupólem (6460 Triple Quad LC/MS, Agilent Technologies). Použitou ionizační technikou byl elektrosprej v negativním módu. Sheath liquid byla pumpována pumpou Agilent Technologies, 1200 series. Separace byly prováděny na křemenné kapiláře o délce 60 cm s vnitřním průměrem 50 µm.

## **Další použitá zařízení**

K zakoncentrování vzorků byla použita rotační odparka (Rotavapor EL 130, Büchi, Flawil, Švýcarsko). Na měření pH byl použit pH-metr (Jenway 3510 pH, East Port Praha, Česká Republika). Vzorky byly vytřepávány na třepačce (Vortexgenie 2, Scientific Industries, Hampshire, Velká Británie) a promíchávány v ultrazvukové lázni (Sonorex RK 100, Bandelin, Barlen, Německo) a zahřívány na blokovém termostatu (Stuart Scientific, SBH 130DC, Staffordshire, Velká Británie). K SPE extrakci byly použity kolonky Supel-Select HLB (6 mL, 200 mg, Supelco, Bellefonte, USA) a vakuová odsávací souprava pro SPE (Visiprep, Supelco). K pipetování sloužily automatické pipety 1-5 mL, 100-1000 µL, 20-200 µL, 10-100 µL a 0,5-10 µL (všechny Biohit, Helsinky, Finsko), 100 µl (Hamilton, Reno, USA), 50-250 µL (Eppendorf, Hamburg, Německo), 5-40 µL (Labsystems, Helsinky, Finsko). K dávkování do plynového chromatografu byla používána 5 µL stříkačka, plynotěsná 10 µL stříkačka (obě Hamilton, Reno, USA) a plynotěsná 100 µL stříkačka (Hamilton-Bonaduz, Švýcarsko).



### 3.3 Odběr vzorků

Reálné vzorky říční vody byly odebírány na třech místech podél toku Vltavy v Praze, v období od dubna 2009 do ledna 2011. Prvním odběrovým místem (A) byla Výtoň pod železničním mostem poblíž centra Prahy, dalším místem (B) byla Trója pod Trojskou lávkou, přibližně 1500 m na výpustí z Ústřední čističky odpadních vod. Poslední odběrové místo vody z Vltavy (C) bylo opět v pražské čtvrti Trója, ovšem cca 500 m pod výpustí z Ústřední čističky odpadních vod. Vzorky byly odebírány 50 cm pod hladinou do 1,5 L PE lahví.

Vzorky Labe byly odebírány během jednoho dne (8.1.2011) podél celého toku této řeky v České republice na šesti odběrových místech, a to ve Vrchlabí, Pardubicích, Mělníku – Klech, Štětí, Ústí nad Labem a Děčíně. Z každého odběrového místa byly vzorky co nejrychleji transportovány do lednice a uchovávány v chladu a tmě. Poté byly vzorky přefiltrovány přes membránový filtr (průměr 47 mm, 0,45  $\mu$ m, Whatman, Maidstone, Velká Británie) pomocí vakuové pumpy KNF LAB Vacuumcontoller (KNF Neuberger, Freiburg, Německo).

Vzorky Dunaje byly odebrány dne 12.5.2011 v centru Regensburgu, Německo, poblíž kamenného mostu (Die Steinerne Brücke).

### 3.4 Příprava zásobních roztoků

#### **Zásobní roztok kyseliny oktanové v acetonitrilu**

Byl připraven zásobní roztok kyseliny oktanové pro derivatizace na isobutylester tak, že do odměrné baňky o objemu 5 mL bylo napipetováno 55  $\mu$ L kyseliny a doplněno po rysku acetonitrilem.

#### **Zásobní roztoky perfluoralkylových karboxylových kyselin v acetonitrilu**

Byly připraveny zásobní roztoky perfluoralkylkarboxylových kyselin v acetonitrilu – kyseliny perfluorpentanové (PFPeA), kyseliny perfluorhexanové (PFHxA), kyseliny perfluorheptanové (PFHpA), kyseliny perfluoroktanové (PFOA), kyseliny perfluornonanové (PFNA) kyseliny perfluordekanové (PFDA), kyseliny perfluorundekanové (PFUnA) a kyseliny perfluordodekanové (PFDaA). Bylo naváženo přesně 50 mg jednotlivých kyselin a kvantitativně byly převedeny do polypropylenových odměrek a doplněny do 5 ml acetonitrilem. Z těchto zásobních

roztoků byl připraven zásobní roztok směsi perfluoralkylových kyselin o koncentraci  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , který byl dále ředěn na požadovanou koncentraci.

### **Zásobní roztoky perfluoralkylových karboxylových kyselin v methanolu**

Pro analýzy na CE-MS byly připraveny zásobní roztoky těchto kyselin a navíc dvou kyselin, a to kyseliny perfluortridekanové (PFTrA) a kyseliny perfluortetradekanové (PFTeA) v methanolu o koncentraci  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ . Bylo tedy naváženo nebo napipetováno 38,8  $\mu\text{L}$  PFPeA, 44,6  $\mu\text{L}$  PFHxA, 91,02 mg PFHpA, 103,52 mg PFOA, 116,02 mg PFNA, 128,52 mg PFDA, 141,02 mg PFUnA, 153,53 mg PFDoA, 166,03 mg PFTrA a 178,53 mg PFTeA do jednotlivých 10 mL odměrných baněk a doplněných po rysku methanolem. Z těchto zásobních roztoků byl připraven zásobní roztok směsi perfluoralkylových karboxylových kyselin o koncentraci  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ .

## **3.5 Příprava vodných vzorků k SPE extrakci**

### **Příprava vodného zásobního roztoku směsi kyselin pro optimalizaci SPE**

Bylo připraveno 250 mL zásobního roztoku perfluoralkylkarboxylových kyselin ( $\text{C}_6 - \text{C}_{12}$ ) o koncentraci  $1 \text{ mg L}^{-1}$  v deionizované vodě tak, že k odměřenému množství vody bylo přidáno 100  $\mu\text{L}$  standardního roztoku směsi perfluoralkylových kyselin o koncentraci  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ . Vzhledem k velmi malému objemu pipetovaných roztoků (zanedbatelný přírůstek objemu) nebyl zásobní roztok připravován přímo v odměrné baňce z důvodu zamezení kontaktu se sklem a špatné manipulace.

### **Příprava reálných vzorků k SPE extrakci**

Vzorky uchovávané v lednici byly před další úpravou nejprve temperovány na laboratorní teplotu. Bylo odměřeno 250 mL vodného vzorku říční vody v odměrné baňce a toto množství bylo přelito do 250 mL polypropylenové nádoby. Ke vzorku bylo přidáno 100  $\mu\text{L}$  iontově-párového činidla tetrabutylamoniumbromidu o koncentraci  $125 \text{ g L}^{-1}$  tak, aby celková koncentrace iontově párového činidla ve vzorku odpovídala požadované koncentraci  $50 \text{ mg L}^{-1}$ . Takto upravené vzorky byly připraveny pro SPE extrakci. Z každého odběrového místa byly připraveny celkem 3 paralelní vzorky.

### **Příprava spikovaných reálných vzorků k SPE extrakci**

Byly připraveny tři vzorky říční vody z Vltavy (odběrové místo A) o objemu 250 mL stejným způsobem, jako reálné vzorky v předchozí kapitole, ale ke vzorku byl ještě přidáván standardní roztok směsi perfluoralkylových karboxylových kyselin ( $C_5 - C_{12}$ ) tak, aby celková koncentrace jednotlivých přidaných perfluoralkylkarboxylových kyselin byla  $1,40 \cdot 10^{-3} \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $1,40 \cdot 10^{-4} \mu\text{g mL}^{-1}$  (respektive  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$  je výsledná koncentrace po SPE zakoncentrování v 625  $\mu\text{L}$  acetonitrilu).

Pro analýzy na CE-MS byly připraveny 3 vzorky Dunaje spikované směsí perfluoralkylových karboxylových kyselin ( $C_5 - C_{14}$ ) o koncentraci  $50 \text{ nmol L}^{-1}$  (výsledná koncentrace  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  v 250  $\mu\text{L}$  acetonitrilu po zakoncentrování s prekoncentračním faktorem 1000) a další set tří vzorků o koncentraci  $62,5 \text{ nmol L}^{-1}$  ( $25 \mu\text{mol L}^{-1}$  byla výsledná koncentrace v 625  $\mu\text{L}$  acetonitrilu při použitém prekoncentračním faktoru 400).

## **3.6 Zakoncentrování a extrakce**

### **Přímé zkoncentrování**

3 reálné vzorky říční vltavské vody označené jako Vltava 1, Vltava 2 a Vltava 3 byly odebrány 6., 7. a 8.4.2009 do tří polypropylenových 1 L nádob v Praze na Výtoni – odběrové místo A. Zakoncentrování vzorků z 500 mL na konečný objem 5 mL bylo provedeno na rotační odparce Rotavapor EL 130 a ke koncentrátu bylo přidáno tolik koncentrované kyseliny fosforečné, aby její výsledná koncentrace v 5 ml vzorku byla  $50 \text{ mmol L}^{-1}$ . Takto připravený zakoncentrovaný vzorek byl upraven na  $\text{pH} = 2,5$  roztokem NaOH ( $2 \text{ mol L}^{-1}$ ) a následně zcentrifugován.

Do derivatizační reakce v prostředí fosfátového pufru bylo vzato 181  $\mu\text{L}$  tohoto roztoku, dále bylo přidáno příslušné množství isobutylalkoholu, pyridinu a IBCF (viz 3.7).

### **SPE extrakce**

Nejprve byla provedena kondicionace SPE kolonky tak, že bylo kolonkou postupně prosáváno 6 mL methanolu a 10 mL deionizované vody rychlostí 1 kapka za vteřinu. Pak byl nasáván vodný vzorek z 250 mL nádoby pomocí polypropylenových hadiček rychlostí 1 – 2 kapky za vteřinu podtlakem 0,4 baru. Poté, kdy byl celý objem vzorku

(250 mL) přečerpán přes kolonku do odpadu, byla stacionární fáze kolonky se zachycenými analyty vysušena proudem vzduchu po dobu 30 minut podtlakem 0,4 bar. Analyty byly eluovány 4 mL methanolu do 15 mL polypropylenové zkumavky se šroubovacím víčkem rychlostí 1 kapka za vteřinu. Eluce musela být prováděna manuálně pomocí pístu z injekční stříkačky, protože eluci přes manifold by docházelo ke kontaminaci vzorku perfluoralkylovými kyselinami (viz kap. 4.2.1). Eluát byl následně odpařen proudem vzduchu při 64 °C do sucha a uložen do lednice. Těsně před derivatizací byl odparek rozpuštěn v 625 µL acetonitrilu a z toho vždy 178 µL bylo bráno k derivatizaci. Z jednoho vodného vzorku byly připraveny vždy 3 vzorky derivatizační směsi, každý z nich byl měřen dvakrát. Bylo tedy provedeno 6 analýz na 1 vodný vzorek. Prekoncentrační faktor byl roven 400, protože došlo k zakoncentrování analytů z původního objemu 250 mL na finální objem 625 µL. Pro kontrolu kvality byl vždy v každé sérii, která obsahovala maximálně 5 vodných vzorků prosávaných najednou přes SPE manifold, měřen také jeden blank připravený z deionizované vody stejným způsobem, jako reálné vzorky.

### **3.7 Derivatizace**

#### **Derivatizace kyselin na isobutylestery v prostředí acetonitrilu**

Derivatizace perfluoralkylových karboxylových kyselin a kyseliny oktanové byla prováděna v polypropylenových mikrozskumavkách (Eppendorf). Reakční médium bylo připravováno o tomto složení: 20 µL zředěného zásobního roztoku kyseliny (či směsi kyselin) v acetonitrilu, 158 µL acetonitrilu, 4 µL pyridinu a 8 µL isobutylalkoholu. Ke směsi bylo přidáno 10 µL chlormravenčanu isobutylnatého (IBCF) jako činidla, tak aby celkový objem reakčního média byl 200 µL. Směs byla promíchána po dobu 20 s v ultrazvukové lázni, pak bylo přidáno 200 µL hexanu a na třepačce po dobu 1 minuty byl vzniklý isobutylester vytřepán do hexanu.

#### **Derivatizace perfluoralkylových karboxylových kyselin na isobutylestery v prostředí fosfátového pufru**

Postup derivatizace je téměř totožný s postupem v předchozí kapitole, s tím rozdílem, že acetonitril v reakčním médiu byl nahrazen fosfátovým pufrem (přídavek 161 µL) a po optimalizaci podmínek byl nalezen optimální přídavek pyridinu 1 µL.

Ostatní chemikálie jsou do reakčního média přidávány ve stejném množství, jako v předchozí kapitole.

### **3.8 GC analýza**

#### **GC-FID**

Analýzy kyseliny oktanové, respektive jejího isobutylesteru po derivatizaci, byly měřeny na plynovém chromatografu PU 4600 s plamenově ionizačním detektorem (FID). Pracovní tlak nosného plynu byl 125 kPa, u plamenově ionizačního detektoru byl tlak vzduchu 16 kPa, tlak vodíku 10 kPa a make-up dusíku 7 kPa. Teplota detektoru byla 300 °C a teplota injektoru 250 °C. Analýzy byly prováděny isotermicky při těchto teplotách: 50, 60, 70, 80 a 90 °C. Průtoková rychlost nosného plynu byla 1,0 mL min<sup>-1</sup>. Byl nastaven split poměr 1:50.

#### **GC-ECD**

Na plynovém chromatografu PU 4600 s detektorem elektronového zachytu (ECD) byly prováděny analýzy isobutylesterů perfluoralkylkarboxylových kyselin. Měřeno bylo za těchto podmínek: nástřik 1 µL vzorku, teplota detektoru 300 °C, teplota injektoru 250 °C, měřicí proud detektoru 120 (relativní škála na přístroji), make-up nosného plynu (dusíku) 25 kPa, tlak byl pomocí regulátoru tlaku nastaven tak, aby odpovídal průtoku kolonou 1,0 mL min<sup>-1</sup>. Analýzy byly měřeny buď při isotermických podmínkách, nebo byl teplotní program nastaven takto: počáteční teplota 50 °C (isotermicky 1 min), nárůst po 10 °C za minutu na konečnou teplotu 170 °C a tam držena tato teplota po dobu 5 min. Celková délka analýzy při těchto podmínkách byla 23 min.

#### **GC-EI-MS**

Isobutylestery perfluoralkylových karboxylových kyselin po derivatizaci byly proměřeny i na plynovém chromatografu s hmotnostním detektorem. Pro všechna měření bylo zvoleno toto nastavení: teplota injektoru 250 °C, teplota MS interface 300 °C, nástřik 1 µL vzorku, splitless mód, kdy se splitter otevřel vždy po 1 minutě a po zbytek analýzy zůstává otevřený, konstantní průtok He kolonou 1 mL min<sup>-1</sup>, SIM mód s monitorováním těchto m/z 69,131,169 a 181. Teplotní program byl nastaven

od 40 °C (isotermicky 3 min) do 170 °C (isotermicky 3 min) s teplotní rampou po 10 °C min<sup>-1</sup>. Celková délka analýzy byla 19 min.

### GC-NCI-MS

Analýzy standardů a reálných vzorků isobutylesterů perfluoralkylkarboxylových kyselin byly měřeny za těchto podmínek: průtok nosného plynu 1,0 mL min<sup>-1</sup>, nástřik 1 µL vzorku, teplota injektoru 250 °C, teplota interface 210 °C, teplotní program: 40 °C (isotermicky 3 min), do 150 °C po 10 °C min<sup>-1</sup> a pak po 30 °C min<sup>-1</sup> do 200 °C, kde je teplota držena po dobu 2 min. Celková délka analýzy byla 17,67 min. Pro všechny analýzy na tomto přístroji byla použita kolona Rtx-200MS (Restek, 30 m, 0,25 ID, film 0,25 µm). Hmotnostní spektrometr pracoval v SIM módu, pro každý pík byly sledovány jiné hodnoty m/z, viz tabulka 4. Vyhodnocován byl pak celkový iontový proud (TIC).

Tabulka 4 – Sledované hodnoty m/z pro jednotlivé píky v daných časových intervalech, podtržené jsou neintenzivnější fragmenty pro jednotlivé kyseliny

<i>Kyselina</i>	<i>Časový interval (min)</i>	<i>t<sub>R</sub> (min)</i>	<i>m/z</i>
PFPeA	4,20 – 7,00	6,35	162, 200, <u>228</u> , 244, 257, 300
PFHxA	7,00 – 8,00	7,48	250, <u>278</u> , 294, 297, 307, 350
PFHpA	8,00 – 9,00	8,57	262, 300, <u>328</u> , 344, 357, 400
PFOA	9,00 – 10,00	9,61	209, 312, 350, <u>378</u> , 407, 450
PFNA	10,00 – 11,00	10,69	209, 281, 362, 400, <u>428</u> , 500
PFDA	11,00 – 12,00	11,48	209, 281, 412, 450, <u>478</u>
PFUnA	12,00 – 12,75	12,34	209, 331, 462, 500, <u>528</u>
PFDoA	12,75 – 17,60	13,16	209, 331, 512, 550, <u>578</u>

### 3.9 HPLC-ESI(-)-MS analýza

Analýzy HPLC-MS byly měřeny na přístroji Esquire 3000 s negativní elektrospreiovou ionizací. Byla použita mobilní fáze o tomto složení: acetonitril, voda a octan amonný (10 mmol L<sup>-1</sup>, pH = 3,6) s poměrem 55 : 15 : 30 a průtokovou rychlostí 0,22 mL min<sup>-1</sup>. V SIM módu byly sledovány tyto m/z: 269 (PFHxA), 319 (PFPeA), 369 (PFOA), 419 (PFNA), 469 (PFDA), 519 (PFUnA) a 569 (PFDoA).

### 3.10 CE-ESI(-)-MS analýza

#### CE-TOF-MS

CE-TOF-MS analýzy byly měřeny na microTOF hmotnostním spektrometru (Bruker Daltonics, Bremen, Německo) se zdrojem elektrosprejové ionizace spojeným s laboratorně vyrobenou kapilární zónovou elektroforézou. Použit byl zdroj vysokého napětí (Model HCN 35000, F.u.G. Elektronik, Rosenheim-Langenpfunzen, Německo). TOF-MS byl optimalizován pro hodnoty  $m/z$  mezi 190 – 800 s použitím negativní ionizace ESI(-)-MS a nastavením těchto parametrů: napětí na kapiláře: -5000 V, end plate offset: -500 V, nebulizační plyn ( $N_2$ ): 0,6 bar, vysoušecí plyn ( $N_2$ ): 4,0 L min<sup>-1</sup>, vysoušecí teplota: 190 °C, ústí kapiláry: 80,0 V, skimmer 1: 33,7 V, skimmer 2: 23,0 V, hexapól 1: 23,0 V, hexapól RF: 250 V, transfer time: 49,0  $\mu$ s, pre-pulse storage: 10,0  $\mu$ s, detektor: 0 V. Dávkování bylo prováděno manuálně hydrodynamicky, kdy byl konec kapiláry ponořen na dobu 10 s (či kratší dávkovací dobu) do vialky se vzorkem, která byla o 5 cm výš vzhledem k vialce s nosným pufrem. Směs isopropanolu a vody (80:20 v/v) obsahující 0,2 % kyseliny mravenčí byla použita jako sheath liquid. Průtok byl nastaven na 8  $\mu$ L min<sup>-1</sup> a byla použita pumpa KDS (Model 601553) a stříkačka (KDS, Holliston, MA, USA). Byla použita kapilára z křemenného skla (fused silica) o délce 28 cm, s vnitřním průměrem 25  $\mu$ m, vnějším průměrem 360  $\mu$ m. 0,1 mm konce kapiláry ústilo do interface detektoru. Pro každý analyt byly sledovány 2 hodnoty  $m/z$ , a to: 219 a 263 pro PFPeA, 269 a 313 (PFHxA) 319 a 363 (PFHpA), 369 a 413 (PFOA), 419 a 463 (PFNA), 469 a 513 (PFDA), 519 a 563 (PFUnA), 569 a 613 (PFDoA), 619 a 663 (PFTrA), 669 a 713 (PFTeA). Byly použity nosné elektrolyty o tomto složení: 1 mol L<sup>-1</sup> kyselina octová s 1 mmol L<sup>-1</sup> octanem amonným v acetonitrilu jako nevodný nosný elektrolyt a vodný roztok mravenčanu amonného (6,25 mol L<sup>-1</sup>, pH = 9,0) s přídavkem 50 % methanolu jako vodný elektrolyt.

#### CE-qqq-MS/MS

CE-qqq-MS/MS analýzy byly měřeny na tandemovém hmotnostním detektoru s trojitým kvadrupólem spojeném s kapilární elektroforézou, oba přístroje od firmy Agilent Technologies. Tandemový hmotnostní detektor s negativní elektrosprejovou ionizací byl nastaven na tyto parametry: napětí na kapiláře -4000 V, nebulizer 10 psi, vysoušecí plyn ( $N_2$ ) 4,0 L min<sup>-1</sup>, vysoušecí teplota 130 °C. Směs isopropanolu a vody

(80:20 v/v) obsahující 0,2 % kyseliny mravenčí byla použita jako sheath liquid. Průtok byl nastaven na 4,0 mL min<sup>-1</sup> s použitím isokratické pumpy model G1310A, 1200 Series Agilent Technologies. Dávkování bylo nastaveno na 200 mbar s<sup>-1</sup>. Průtoková rychlost byla nastavena na 4 µL min<sup>-1</sup>. Byl použit nosný elektrolyt o složení 1 mol L<sup>-1</sup> kyselina octová s 1 mmol L<sup>-1</sup> octanem amonným v acetonitrilu. Stálý tlak elektrolytu do kapiláry při analýze byl nastaven na 15 mbar. Pro každý analyt byl sledován MRM přechod odpovídající molekulovému iontu (mateřský ion) na dekarboxylovaný ion (dceřiný ion) viz tabulka 5.

Tabulka 5 – Sledované m/z, fragmentační a kolizní energie jednotlivých MRM přechodů

<i>Kyselina</i>	<i>Mateřský ion</i>	<i>Dceřiný ion</i>	<i>Fragmentátor (V)</i>	<i>Kolizní energie (V)</i>
PFPeA	263	219	190	1
PFHxA	313	269	200	2
PFHpA	363	319	210	3
PFOA	413	369	210	4
PFNA	463	419	220	4
PFDA	513	469	230	4
PFUnA	563	519	240	5
PFDoA	613	569	250	6
PFTTrA	663	619	260	6
PFTeA	713	669	270	7



## 4. Výsledky a diskuze

### 4.1 Plynová chromatografie

Největší část této práce je věnována vývoji a optimalizaci metody stanovení perfluoralkylových karboxylových kyselin metodou plynové chromatografie.

#### 4.1.1 Kvalitativní analýza PFCA

##### 4.1.1.1 Vývoj derivatizační reakce

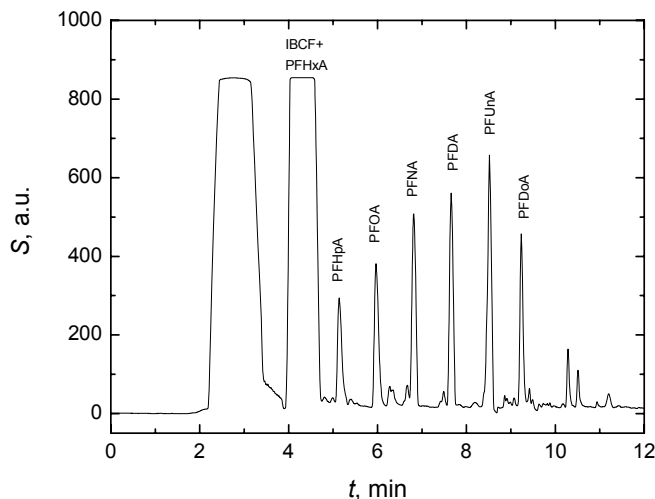
Tato práce navazuje na naši předchozí práci – diplomovou práci [70], kdy byla derivatizační reakce vyvinuta a optimalizována pro homologickou řadu perfluoralkylkarboxylových kyselin s délkou řetězce  $C_7 - C_{10}$  v prostředí acetonitrilu. Analýzy byly prováděny na přístrojích GC-ECD a GC-EI-MS. Zde je shrnuto několik optimalizačních kroků derivatizační reakce v prostředí acetonitrilu vedoucích k zlepšení účinnosti reakce a citlivosti měření. Nejprve byl optimalizován čas derivatizační reakce v rozsahu 0 – 50 min a optimum bylo nalezeno při 8 minutách. Poté bylo nalezeno optimální složení reakčního média, které obsahovalo 20  $\mu\text{L}$  standardu perfluoralkylkarboxylové kyseliny nebo směsi perfluoralkylkarboxylových kyselin ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) v acetonitrilu, 158  $\mu\text{L}$  acetonitrilu, 8  $\mu\text{L}$  isobutylalkoholu, 4  $\mu\text{L}$  pyridinu a 10  $\mu\text{L}$  IBCF. V tomto kroku byl optimalizován přírůstek pyridinu v rozsahu 0 – 20  $\mu\text{L}$  na 200  $\mu\text{L}$  celkového objemu reakční směsi, což odpovídá rozsahu jeho koncentrací 0 –  $1,238 \text{ mol L}^{-1}$ . Změny objemu přírůstků ostatních složek reakčního média neměly na reakci výraznější vliv. Posledním parametrem byla teplota reakce, kde bylo výsledkem zachování laboratorní teploty. Měřený rozsah teplot při reakci byl 20 – 60  $^{\circ}\text{C}$ .

Jednotlivými optimalizačními kroky bylo dosaženo zlepšení účinnosti této metody vyjádřené plochami píků o více než 60 % [70].

##### 4.1.1.2 Analýza isobutylesterů PFCA pomocí GC-ECD

Příklad separace standardů PFCA ( $C_6 - C_{12}$ ), derivatizovaných na isobutylestery za optimálních podmínek v acetonitrilu a analyzovaných pomocí GC-ECD je zobrazena na obrázku 4.1. V průběhu práce byly postupně přidávány další standardy perfluoralkylových karboxylových kyselin, zde je přidána kyselina perfluorhexanová

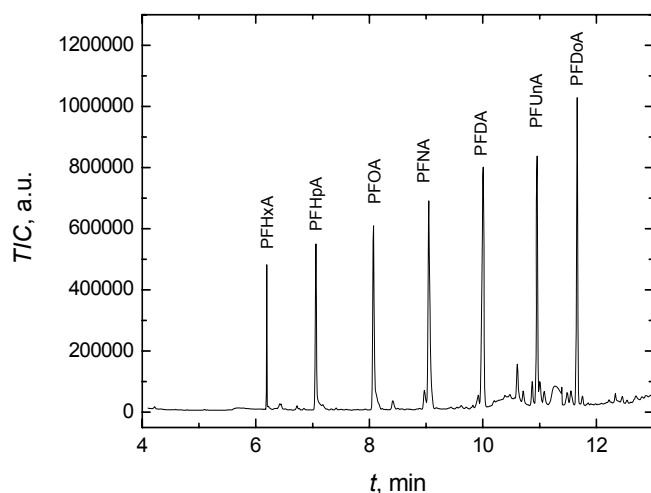
(PFHxA), dále kyselina perfluorundekanová (PFUnA) a kyselina perfluordodekanová (PFDoA). Na obrázku 4.1 je vidět velký pík IBCF, který koeluuje s píkem isobutylesteru PFHxA.



Obrázek 4.1 – GC-ECD chromatogram směsného vzorku standardů perfluoralkylkarboxylových kyselin (každá  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) derivatizovaných na isobutylestery, kolona SPB-5 ( $15 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm i.d.}, 0,25 \mu\text{m}$ ) dávkovaný objem  $1 \mu\text{L}$  (splitless  $1 \text{ min}$ ), teplota detektoru  $300^\circ\text{C}$ , teplota injektoru  $250^\circ\text{C}$ ,  $50^\circ\text{C}$  ( $1 \text{ min}$ ) do  $170^\circ\text{C}$  po  $10^\circ\text{C min}^{-1}$ , make-up  $25 \text{ kPa}$ , průtoková rychlost nosného plynu ( $\text{N}_2$ )  $0,44 \text{ mL min}^{-1}$

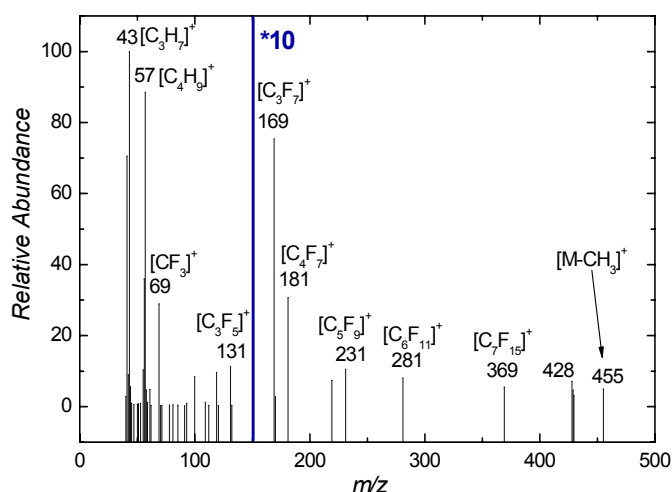
#### 4.1.1.3 Analýza isobutylesterů PFCA pomocí GC-EI-MS

Příklad separace standardů PFCA ( $\text{C}_6 - \text{C}_{12}$ ), derivatizovaných na isobutylestery za optimálních podmínek v acetonitrilu a analyzovaných pomocí GC-EI-MS je zobrazena na obrázku 4.2.



Obrázek 4.2 – GC-EI-MS chromatogram směsného vzorku standardů perfluoralkylkarboxylových kyselin (každá  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) derivatizovaných na isobutylestery, kolona DB-5MS ( $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm i.d.}, 0,25 \mu\text{m}$ ), dávkovaný objem  $1 \mu\text{L}$  (splitless 1 min), teplota MS interface  $300^\circ\text{C}$ , teplota injektoru  $250^\circ\text{C}$ , teplotní program:  $40^\circ\text{C}$  (3 min) do  $170^\circ\text{C}$  (3 min) po  $10^\circ\text{C min}^{-1}$ , konstantní průtoková rychlost He  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , SIM mód:  $m/z = 69, 131, 169$  a  $181$

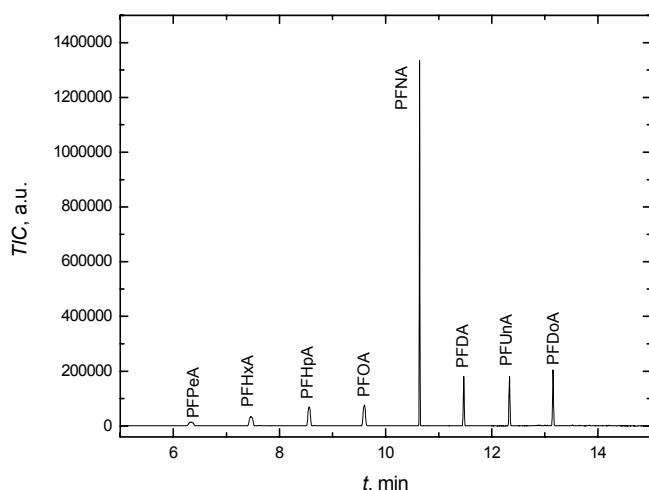
V MS spektrech isobutylesterů perfluoralkylkarboxylových kyselin se opakují některé intenzivní fragmenty, které vznikají štěpením fluorovaného řetězce ( $69 [\text{CF}_3]^+$ ,  $131 [\text{C}_3\text{F}_5]^+$ ,  $169 [\text{C}_3\text{F}_7]^+$ ,  $181 [\text{C}_4\text{F}_7]^+$ ,  $219 [\text{C}_4\text{F}_9]^+$  atd.). Některé z nich jsou identifikovány v obr. 4.3 a lze je využít pro kvantitativní analýzu. Pro měření kalibračních závislostí byly vybrány 4 nejintenzivnější  $m/z$ , a to:  $69, 131, 169$  a  $181$ . Pro kvalitativní analýzu byly navíc použity fragmenty  $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ . Velmi intenzivními fragmenty jsou i ionty  $43$  a  $57$ , které odpovídají isopropylu  $[\text{C}_3\text{H}_7]^+$ , resp. isobutylu  $[\text{C}_4\text{H}_9]^+$  (jeden z nich je vždy základním píkem). Na obrázku 4.3 je zobrazen příklad hmotnostního spektra isobutylesteru kyseliny perfluoroktanové měřeného pomocí GC-EI-MS. Dva velmi intenzivní píky, odpovídající látkám vznikajícím při derivatizační reakci jako produkty IBCF, byly identifikovány pomocí GC-EI-MS ve scan módu. Prvním z nich byl bis(isobutylester) kyseliny ethandiové, z kterého při derivatizaci vzniká druhý produkt – bis(isobutylester) kyseliny uhličité. Oba eluují nejméně 5 minut za posledním píkem perfluoralkylkarboxylových kyselin. V SIM módu metody GC-EI-MS ani v GC-ECD nejsou pozorovány, jelikož tyto molekuly nejsou halogenované, ale mají čistě uhlovodíkový řetězec.



Obrázek 4.3 – Hmotnostní spektrum (EI) isobutylesteru PFOA měřené ve scan módu

#### 4.1.1.4 Analýza isobutylestrů PFCA pomocí GC-NCI-MS

Separace perfluoralkylkarboxylových kyselin byla také vyzkoušena na plynovém chromatografu s negativní chemickou ionizací. Výchozí parametry měření byly převzaty z předchozího měření na GC-EI-MS a optimalizovány na aktuální podmínky. Nejprve byla proměřena směs perfluoralkylových karboxylových kyselin (včetně přidané kyseliny perfluorpentanové), tedy jejich isobutylesterů, ve scan módu, aby bylo možno určit nejvhodnější  $m/z$  pro měření jednotlivých fragmentů v SIM módu. Pro každý pík pak bylo vybráno několik fragmentů (viz. tab 4. v experimentální části, kap. 3.8), které byly měřeny vždy jen pro daný pík a vyhodnocován byl jejich součet, tedy celkový iontový proud (TIC). Na obrázku 4.4 je zobrazena separace perfluoralkylových karboxylových kyselin s délkou perfluorovaného řetězce  $C_5 - C_{12}$  derivatizovaná v prostředí acetonitrilu na isobutylestery naměřená na přístroji GC-NCI-MS.

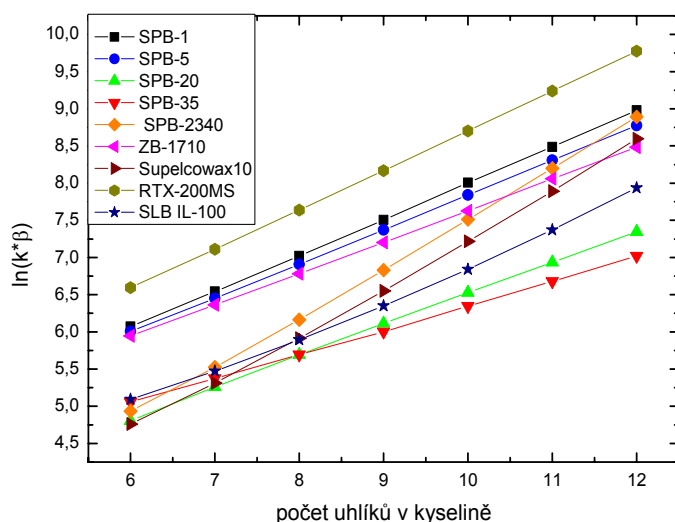


Obrázek 4.4 – GC-NCI-MS chromatogram směsi perfluoralkylkarboxylových kyselin derivatizovaných na isobutylestery ( $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Kolona Rtx-200MS ( $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm i.d.}, 0,25 \mu\text{m}$ ), dávkovaný objem  $1 \mu\text{L}$  (splitless 1 min), teplota injektoru  $250^\circ\text{C}$ , teplota interface  $210^\circ\text{C}$ , teplotní program:  $40^\circ\text{C}$  (3 min) do  $150^\circ\text{C}$  po  $10^\circ\text{C min}^{-1}$  a pak po  $30^\circ\text{C min}^{-1}$  do  $200^\circ\text{C}$  (2 min), konstantní průtoková rychlost He  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , SIM mód, sledované  $m/z$  viz tabuka 4, kapitola 3.8

#### 4.1.1.5 Výběr vhodné stacionární fáze a proměření retenčních charakteristik isobutylesterů PFCA

Mechanismus interakcí perfluorovaných sloučenin a jejich derivátů s běžnými stacionárními fázemi, používanými v plynové chromatografii, není zatím příliš prozkoumaný. Jedním z úkolů naší práce se proto stalo studium těchto interakcí. Byly proměřeny a srovnány retenční charakteristiky isobutylesterů perfluoralkylových karboxylových kyselin na 9 běžně dostupných kapilárních kolonách s různými stacionárními fázemi, aby bylo možno vybrat optimální stacionární fázi pro separaci těchto látek. Analýzy byly měřeny za isothermických podmínek při  $60^\circ\text{C}$ . Jelikož jednotlivé kolony byly dostupné v různých délkách a tloušťkách stacionární fáze, bylo nutno korigovat retenční charakteristiku  $k$  – retenční poměr, fázovým poměrem  $\beta$  tak, abychom získali veličinu, která je nezávislá na parametrech kolony.

Na obrázku 4.5 je vynesena závislost logaritmu retenčního faktoru  $k$  korigovaného fázovým poměrem  $\beta$  na počtu uhlíků perfluoralkylkarboxylové kyseliny pro jednotlivé kolony.



Obrázek 4.5 – Závislost logaritmu retenčního faktoru  $k$ , korigovaného fázovým poměrem  $\beta$  na počtu atomů uhlíku v molekule perfluoralkylkarboxylové kyseliny pro 9 různých kapilárních GC kolon, měřeno za isotermických podmínek při 60 °C na přístroji GC-ECD

Z obrázku 4.5 je zřejmé, že tyto logaritmické závislosti jsou pro všechny kolony lineární, s korelačním koeficientem  $R^2 \geq 0,9977$ , nezávisle na typu stacionární fáze. Z toho lze usuzovat, že retenční mechanismus na vybraných stacionárních fázích je nezávislý na počtu atomů uhlíku a že příspěvek skupiny  $-CF_2-$  k retenci je konstantní pro vybrané perfluorované homology. Nejvyšší retence byla zaznamenána u kolony Rtx-200MS s trifluorpropylmethylpolysiloxanovou fází následovaná kolonou SPB-1 (100 % methylpolysiloxan) a kolonou SPB-5 (5 % fenylmethylpolysiloxan). Nejvyšší retence u polyfluorované stacionární fáze je zřejmá, platí tu známé pravidlo “podobné v podobném rozpouštěj” (*similia similibus solvuntur*). Retence na kolonách SPB-1 a SPB-5 naznačuje tendenci isobutylesterů perfluoralkylkarboxylových kyselin spíše upřednostňovat nepolární stacionární fáze před polárními. Zajímavým faktem je, že u kolon Supelcowax 10 (polyethyleneglycol) a SP-2340 (100 % bis-kyanopropylpolysiloxan) je zaznamenána největší směrnice přímky. Ta je zřejmě dána větším příspěvkem skupiny  $-CF_2-$  k celkové retenci. Tento fakt může být vysvětlen vyšším podílem polárních interakcí k retenčnímu mechanismu ve srovnání s méně polárními polysiloxanovými stacionárními fázemi. Vzhledem k většímu sklonu zaznamenanému u těchto dvou polárních kolon v porovnání s Rtx-200MS, lze

předpokládat, že pořadí hodnot retenčních faktorů  $k$  by se mohlo měnit přibližně u perfluoreikosanové kyseliny pro kolonu SP-2340 a u perfluortetraeikosanové kyseliny u kolony Supelcowax 10. K řešení rozsahu retenčního příspěvku různých druhů interakcí mezi analyty a stacionární fází byla použita McReynoldsova klasifikace stacionárních fází, která nám udává polaritu stacionární fáze a selektivitu separace daných analytů [119] (McReynoldsovy konstanty pro použité stacionární fáze jsou zaznamenány v tabulce 6, data pro kolony Rtx-200MS a SLB-IL100 nejsou zatím dostupná). Byla provedena korelace mezi jednoduchými McReynoldsovy parametry  $x'$  (přenos náboje – donory),  $y'$  (vodíkové vazby – donory),  $z'$  (orientace),  $u'$  (přenos náboje – akceptory),  $s'$  (vodíkové vazby – akceptory) [120] a jejich součtem, se směrnici přímk jednotlivých kolon z obrázku 4.5.

Tab. 6 – McReynoldsovy parametry stacionárních fází

<i>Typ kolony</i>	<i>McReynoldsovy parametry</i>					
	$x'$	$y'$	$z'$	$u'$	$s'$	$\Sigma$
SPB-1	4	58	43	56	38	199
SPB-5	19	74	64	93	62	312
SPB-20	67	116	117	174	131	605
ZB-1701	67	170	153	228	171	789
SPB-35	101	146	151	219	202	819
Supelcowax 10	305	551	360	562	484	2262
SPB-2340	419	654	541	758	637	3009

Korelace obecně nevyšly příliš dobře. S výjimkou dvou kolon s větším sklonem přímky, tedy Rtx-200MS a Supelcowax 10, byla nalezena jen malá korelace mezi směrnici přímky jednotlivých kolon s McReynoldsovy koeficienty. Hodnoty  $R^2$  odpovídají pro korelace s  $x'$  0,8894, pro  $s'$  0,8173, pro  $z'$  0,6660 a pro  $y'$  0,5086 a pro jejich celkový součet 0,7143. Proto z nejlepších korelací u parametrů  $x'$  a  $s'$ , které popisují interakce přenosu náboje a vodíkové vazby, vyplývá, že tyto polární interakce by mohly hrát důležitou roli v retenčním mechanismu perfluoralkylkarboxylových kyselin na vybraných stacionárních fázích. Je nutné zdůraznit, že tyto více či méně kvalitativní vztahy neudávají žádné konkrétní kvantitativní údaje a do budoucna by bylo

vhodné se podrobněji zaměřit na kvantitativní popsání retenčních charakteristik vybraných analytů.

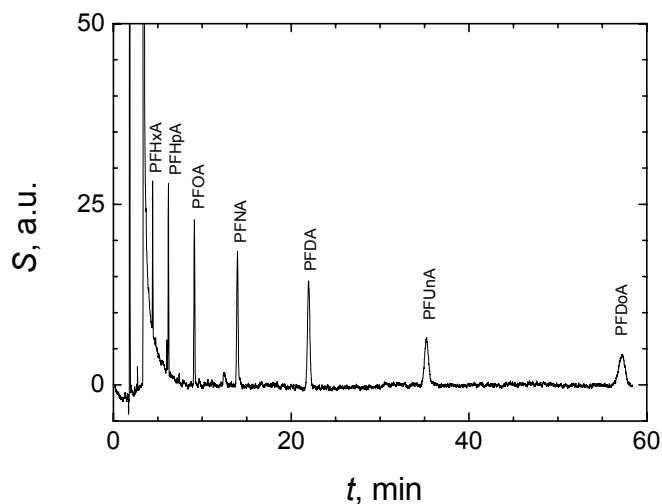
Shrnutím získaných výsledků můžeme prohlásit, že isobutylestery perfluoralkylkarboxylových kyselin ( $C_6 - C_{12}$ ) se chovají neobvykle. Na jedné straně je dosahováno nejvyšší retence na nepolárních stacionárních fázích a na straně druhé je největší příspěvek skupiny  $-CF_2-$  k retenčnímu faktoru  $k$  a nejlepší korelace s  $x'$  a  $s'$  McReynoldsovými parametry zaznamenán na polárních stacionárních fázích. Toto nejednoznačné chování ukazuje, že jakýkoli odhad chování a retenčních charakteristik perfluorovaných látek je velmi složitý.

Jako optimální byla vybrána kolona Rtx-200MS s nejvyšší retencí, nejlepší separací isobutylesterů a zároveň krátkou dobou analýzy. Proto většina dalších analýz byla prováděna právě na této koloně.

#### ***4.1.1.6 Retence a termodynamické parametry isobutylesterů PFCA na koloně Rtx-200MS***

Pro objasnění separačního mechanismu byla provedena charakterizace retenčních vlastností a výpočet termodynamických parametrů vybraných isobutylesterů perfluoralkylkarboxylových kyselin na koloně Rtx-200MS. Na obrázku 4.6 je ukázka separace isobutylesterů PFCA na této koloně za isothermických podmínek.





Obrázek 4.6 – GC-ECD chromatogram směsi isobutylesterů PFCA o koncentraci  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  na koloně Rtx-200MS (30 m, 0,25 mm ID, 0,25  $\mu\text{m}$ ) za izotermických podmínek při  $70^\circ\text{C}$ , dávkování 1  $\mu\text{L}$  (split poměr 1:50), teplota detektoru  $300^\circ\text{C}$ , teplota injektoru  $250^\circ\text{C}$

Pro výpočty termodynamických veličin bylo nutné zjistit od výrobce kolony Rtx-200MS, firmy Restek, potřebné parametry stacionární fáze. Především bylo potřeba znát hustotu a molární hmotnost stacionární fáze. Hodnota hustoty nám byla poskytnuta, ale molární hmotnost je bohužel výrobním tajemstvím a při výpočtech jsme se museli obejít bez znalosti tohoto parametru stacionární fáze. Z parametrů kolony, jako je délka a tloušťka filmu, byl vypočítán objem stacionární fáze a ze známé hustoty také hmotnost stacionární fáze. Zde jsou uvedené parametry stacionární fáze: hustota  $1,284 \text{ g mL}^{-1}$ , tloušťka filmu  $0,25 \mu\text{m}$ , délka kolony 30 m, objem stacionární fáze  $5,8846 \cdot 10^{-3} \text{ mL}$ , hmotnost stacionární fáze:  $7,5558 \cdot 10^{-3} \text{ g}$ . Vypočtená termodynamická data včetně jejich intervalů spolehlivosti pro  $(1-\alpha)$  rovna 0,95, jsou uvedena v tabulce 7.

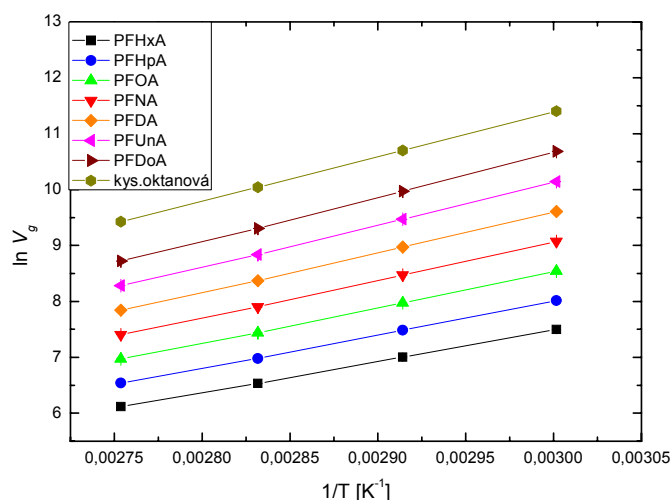
Tabulka 7 – Termodynamické parametry isobutylesterů perfluoralkylových karboxylových kyselin a isobutylesteru kyseliny oktanové měřené na koloně Rtx-200MS

<i>Kyselina</i>	$V_g \text{ (mL g}^{-1}\text{)}^*$	$K_D^*$	$\Delta H \text{ (kJ mol}^{-1}\text{)}$	$\Delta G \text{ (kJ mol}^{-1}\text{)}^*$	$\Delta S \text{ (J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}\text{)}^*$
PFHxA	$1101 \pm 13$	$1776 \pm 13$	$46,4 \pm 0,5$	$-3,33 \pm 0,03$	$145 \pm 2$
PFHpA	$1781 \pm 13$	$2872 \pm 13$	$49,6 \pm 0,6$	$-4,72 \pm 0,02$	$158 \pm 2$
PFOA	$2905 \pm 14$	$4686 \pm 14$	$52,8 \pm 0,6$	$-6,12 \pm 0,01$	$172 \pm 2$
<i>Kys. oktanová</i>	$23010 \pm 42$	$37116 \pm 42$	$61,3 \pm 0,6$	$-12,02 \pm 0,01$	$214 \pm 2$
PFNA	$4770 \pm 18$	$7694 \pm 18$	$56,1 \pm 0,7$	$-7,53 \pm 0,01$	$185 \pm 2$
PFDA	$7863 \pm 2$	$12683 \pm 2$	$59,4 \pm 0,7$	$-8,95 \pm 0,00$	$199 \pm 2$
PFUnA	$12943 \pm 42$	$20878 \pm 42$	$62,6 \pm 0,9$	$-10,37 \pm 0,01$	$213 \pm 3$
PFDoA	$21379 \pm 49$	$34486 \pm 49$	$65,9 \pm 0,9$	$-11,81 \pm 0,01$	$226 \pm 3$

\* hodnoty měřeny při 70 °C

Vztahy mezi počtem uhlíků v molekule perfluoralkylkarboxylové kyseliny a  $\ln V_g$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta G$  a  $\Delta S$  jsou dokonale lineární (všechny  $R^2 \approx 1$ ). Tato skutečnost naznačuje, že teoretické předpoklady o chování systému jsou splněny a výpočet dalších parametrů je tedy možný.

Na obrázku 4.7 jsou zobrazeny lineární závislosti logaritmů  $V_g$  na reciproké hodnotě teploty  $1/T$  (Van't Hoffovy křivky) [109-121], kde směrnice přímky reprezentuje molární entalpii rozpouštění dělenou univerzální plynovou konstantou, tedy  $\Delta H/R$ .



Obrázek 4.7 – Závislost logaritmu specifického retenčního objemu  $V_g$  na  $1/T$  (Van't Hoffovy křivky) pro isobutyestery perfluoralkylkarboxylových kyselin a isobutylester kyseliny oktanové na koloně Rtx-200MS, měřeno na GC-ECD

Aby bylo možno srovnat hodnoty  $\Delta H$  homologické řady perfluoralkylových karboxylových kyselin s nefluorovanou mastnou kyselinou, byla do souboru našich analytů přidána kyselina oktanová (kaprilová). Z tabulky 7 a obrázku 4.7 je zřejmé, že fluorace alkylového zbytku v molekule výrazně snižuje retenci PFOA v porovnání s nefluorovanou kyselinou, tedy kyselinou oktanovou. Srovnáním příspěvků  $\Delta H/RT$  s  $\Delta S/R$  k hodnotě  $\ln V_g$  lze zjistit, že entropický příspěvek odpovídá 112 % pro PFOA a 120 % pro kyselinu oktanovou vůči enthalpickému příspěvku. Entropický příspěvek pro ostatní perfluoralkylkarboxylové kyseliny se pohybuje mezi 107 % až 118 %. Tyto hodnoty ukazují, že sorpce perfluoralkylových karboxylových kyselin a kyseliny oktanové na tuto vybranou fluorovanou stacionární fázi není jednoznačně řízena ani enthalpicky, ani entropicky, protože oba parametry přispívají k retenci téměř totožně [121]. To znamená, že distribuce analytů mezi stacionární a mobilní fází není řízena jen interakcí mezi stacionární fází a analytem, ale podstatná je i interakce s mobilní fází. Tato hypotéza bude předmětem další experimentální práce.

Hodnoty  $V_g$  a  $K_D$  pro PFOA jsou téměř osmkrát menší v porovnání s kyselinou oktanovou. Hodnoty odpovídající kyselině oktanové jsou srovnatelné s PFDoA, tedy kyselinou s 12 uhlíky. Hodnoty  $\Delta H$  a  $\Delta S$  jsou pro PFOA i kyselinu oktanovou

srovnatelné, kdežto hodnota  $\Delta G$  je přibližně dvakrát větší pro kyselinu oktanovou. Teplotní závislost hodnot  $V_g$  a  $K_D$  pro PFOA v porovnání s kyselinou oktanovou je znázorněna v tabulce 8.

Poněkud strmější pokles těchto hodnot pro kyselinu oktanovou ve srovnání s PFOA je v souladu s její vyšší hodnotou  $\Delta H$ .

Tabulka 8 – Hodnoty specifického retenčního objemu  $V_g$  a distribučních konstant  $K_D$  isobutylesteru kyseliny perfluoroktanové a kyseliny oktanové, měřené na koloně Rtx-200MS za různých teplot kolony

<i>Teplota kolony (K)</i>	<i><math>V_g</math> (mL g<sup>-1</sup>)</i>		<i><math>K_D</math></i>	
	<i>PFOA</i>	<i>Kyselina oktanová</i>	<i>PFOA</i>	<i>Kyselina oktanová</i>
323,15	9508	89733	14443	136307
333,15	5122	44366	8022	69479
343,15	2905	23010	4686	37116
353,15	1701	12396	2823	20578
363,15	1604	7153	1817	12210

Pro lepší a důkladnější pochopení interakcí mezi trifluorpropylmethylsiloxanovou stacionární fází v koloně Rtx-200MS a vybranými estery perfluoralkylkarboxylových kyselin byl použit model LFER (Abraham's Linear Free Energy Relationship) [122]. Cílem bylo vyhodnotit deskriptory fluorované stacionární fáze pomocí deskriptorů perfluorovaných látek a sledovat různé typy interakcí a jejich příspěvky k celkové retenci isobutylesterů perfluoralkylkarboxylových kyselin, vyjádřené retenčním faktorem  $k$ . Deskriptory použité stacionární fáze, stejně jako deskriptory perfluoralkylkarboxylových kyselin nejsou dostupné. Přesto byly látkové deskriptory vypočítány pomocí programu ACD/ADME Suite 5.0 - Absolv software, ( $\Sigma\alpha^H_2$  – míra kyselosti,  $\Sigma\beta^H_2$  – míra zásaditosti,  $\pi^H_2$  - polarizovatelnost,  $\log L^{16}$  – rozdělení mezi plynem a hexadekanem,  $V_x$  – specifický objem,  $R_2$  – přebytek molární frakce), podrobněji popsáno v publikaci M.H. Abrahama [122].

Multiregresní analýza výsledných parametrů ukazuje, že všechny vypočítané deskriptory jsou statisticky závislé v rámci homologické řady PFCA, a proto není možné je použít pro výpočet deskriptorů z hodnot  $\log k$  v Abrahamově rovnici [122].

Tento přístup tedy není příliš vhodný pro výpočet deskriptorů. Deskriptory stacionární fáze by bylo nutné stanovit experimentálně pomocí standardů, u kterých jsou jejich látkové deskriptory známy [122].

#### 4.1.2 Kvantitativní analýza

Poté, co byla vybrána vhodná stacionární fáze pro separaci isobutylesterů perfluoralkylkarboxylových kyselin a mechanismus separace byl důkladně prozkoumán, byla naše práce zaměřena na kvantitativní analýzu, především na určení hodnot limitů detekce a stanovitelnosti a porovnání citlivostí jednotlivých plynových chromatografů mezi sebou.

##### 4.1.2.1 Srovnání limitů detekce GC-ECD a GC-EI-MS pro prostředí acetonitrilu

Byly proměřeny kalibrační závislosti isobutylesterů perfluoralkylkarboxylových kyselin v prostředí acetonitrilu na přístrojích GC-ECD a GC-EI-MS a vypočítány limity detekce a stanovitelnosti. Tyto hodnoty byly počítány ze společných směrodatných odchylek regrese *SDR* (viz kap. 2.5, vztah 14 a 15).

Tabulka 9 – Detekční limity (LOD,  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) a limity stanovitelnosti (LOQ,  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) isobutylesterů perfluoralkylkarboxylových kyselin v prostředí acetonitrilu pro GC-ECD a GC-EI-MS

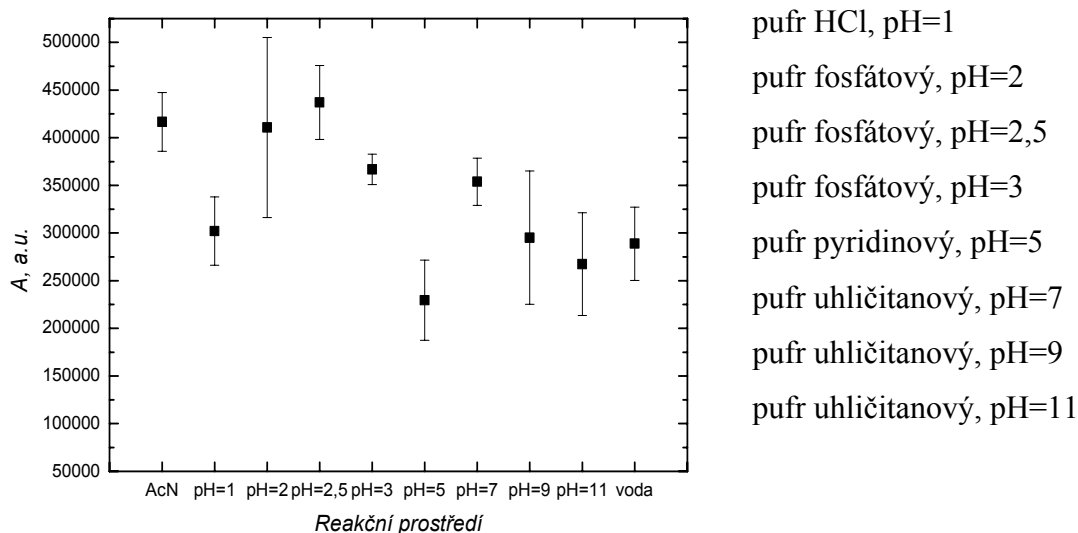
	<i>GC-ECD</i>		<i>GC-EI-MS</i>	
	<i>LOD</i>	<i>LOQ</i>	<i>LOD</i>	<i>LOQ</i>
PFHxA	-	-	0,2	0,7
PFHpA	0,1	0,4	0,2	0,7
PFOA	0,1	0,2	0,4	1,4
PFNA	0,2	0,7	0,3	1,1
PFDA	1,8	2,7	1,9	6,4
PFUnA	-	-	2,2	7,3
PFDoA	0,2	0,5	0,6	2,0

Hodnoty LOD a LOQ pro isobutylestery PFCA uvedené v tabulce 9 nejsou dostatečně nízké, aby mohly být tyto látky přímo stanoveny ve vzorcích životního prostředí. Vezmeme-li ale v úvahu použití vhodné prekoncentrace s dostatečným

prekoncentračním faktorem (min. 100), získali bychom hodnoty koncentrací řádově jednotek až desítek ppb. V této oblasti už se pak pohybují hodnoty naměřených a publikovaných koncentrací PFCA v reálných vzorcích životního prostředí [26,91,94], čili by tato metoda měla být použitelná pro stanovení PFCA v těchto vzorcích. LOD a LOQ vycházejí pro isobutylestery PFCA nejnižší u GC-ECD, v řádech desetin (u PFOA nejnižší hodnota LOD dokonce  $0,06 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) až jednotek  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . GC-EI-MS je řádově shodný, číselně vychází nepatrně hůř. Další snahou bylo převedení derivatizační reakce do vodného prostředí z důvodu zjednodušení prekoncentrace.

#### 4.1.2.2 Derivatizační reakce ve vodném prostředí

Předběžná měření ukázala, že derivatizace PFCA ve vodném prostředí probíhá nedostatečně, a proto bylo přikročeno k její optimalizaci. Jedním z hlavních parametrů ovlivňujících reakci bude v případě organických kyselin hodnota pH reakčního média, a proto byly pro derivatizaci vyzkoušeny různé druhy pufrů v rozsahu  $\text{pH} = 1 - 11$  o koncentraci  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  (HCl pufr  $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ), které nahradily prostředí acetonitrilu v derivatizační směsi. Následující optimalizační kroky byly měřeny jen pro PFOA pomocí GC-EI-MS.



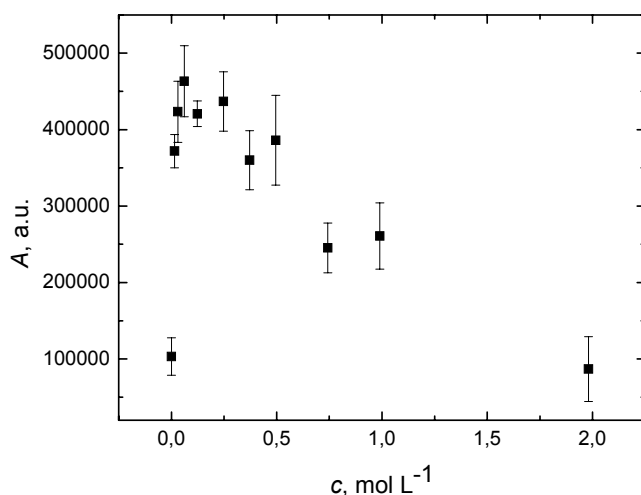
Obrázek 4.8 – Závislost velikosti plochy píku isobutylesteru PFOA na prostředí pufru o různém pH

Výběr pufrů pro takto velké rozpětí pH byl značně omezen, protože pufrы nesmí obsahovat žádnou derivatizovatelnou skupinu, jako např. karboxylovou, či aminoskupinu, která by snižovala účinnost derivatizační reakce. Tudiž bylo nutné volit

pouze jednoduché anorganické pufrы, namísto běžných pufrů s variabilnějším rozpětím pH.

Jako optimální byl vybrán fosfátový pufr o pH 2,5. Velký pokles plochy píku byl zaznamenán u pyridinového pufru, a to pravděpodobně z důvodu nadbytku pyridinu, který snižuje účinnost derivatizační reakce, jak bylo prokázáno při optimalizaci přídavku pyridinu (viz dále). Z hodnoty pH 2,5 lze usuzovat, že derivatizace probíhá za daných podmínek snáze s klesající disociací PFOA. Dalším logickým krokem byla optimalizace koncentrace fosfátového pufru o pH 2,5. Byly proměřeny koncentrace 1, 10, 50 a 100 mmol L<sup>-1</sup> a jako optimální koncentrace pufru byla nalezena hodnota 50 mmol L<sup>-1</sup>. Snížení či zvýšení koncentrace pufru nevedlo k výraznému zvětšení ploch píků vznikajícího isobutylesteru PFOA.

Při optimalizaci reakce v acetonitrilu se jako parametr nejvíce ovlivňující výtěžek reakce jevil přídavek pyridinu jako katalyzátoru reakce. Proměřeny byly přídavky pyridinu v rozsahu koncentrace 0 – 1,98 mol L<sup>-1</sup>, což odpovídalo přídavku 0 – 32 μL na celkový objem 200 μL reakčního média. Na obrázku 4.9 můžeme pozorovat, že s klesajícím množstvím pyridinu v derivatizační směsi rostou plochy píků isobutylesterů PFOA. Podobný trend byl pozorován i u reakce v prostředí acetonitrilu, kde byl jako optimální přídavek nalezen objem 4 μL pyridinu. Jeho dalším snižováním plochy píků opět nepatrně klesly. V prostředí fosfátového pufru byl optimální přídavek 1 μL čistého pyridinu, který odpovídá koncentraci 0,06 mol L<sup>-1</sup> a dalším snižováním koncentrace pyridinu píky isobutylesteru PFOA opět klesaly. Pokud do reakce pyridin nepřidáme vůbec, výtěžek reakce je minimální. Přítomnost malého množství pyridinu jako katalyzátoru reakce je tedy nutná. Podrobnější diskuzi o funkci pyridinu v těchto reakcích lze nalézt v pracích Huška a kol. [71-75].



Obrázek 4.9 – Závislost plochy píku isobutylesteru PFOA na koncentraci pyridinu v prostředí fosfátového pufru

Srovnání derivatizace v acetonitrilu a ve vodě ukazuje, že: (a) po optimalizačních krocích byla plocha píku isobutylesteru odpovídající koncentraci PFOA  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  v acetonitrilu rovna  $417000 \pm 30800$  a.u., (b) ve fosfátovém pufru o pH 2,5 a koncentraci  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  a s optimálním přidavkem pyridinu za stejných podmínek měření byla naměřena plocha píku isobutylesteru PFOA  $460000 \pm 46400$  a.u. Znamená to tedy, že došlo ke zlepšení výtěžku derivatizační reakce pro PFOA ve fosfátovém pufru o téměř 10 % oproti reakci v acetonitrilu. Možnost provedení reakce ve vodném prostředí značně zjednodušuje celou analytickou metodu a zaručuje snadnější práci při stanovení PFCA.

#### 4.1.2.3 Srovnání limitů detekce GC-EI-MS a GC-ECD ve fosfátovém pufru

Pro GC-ECD a GC-EI-MS byly proměřeny nové kalibrace v rozsahu koncentrací  $0,02 - 10 \mu\text{g mL}^{-1}$  pro prostředí fosfátového pufru.

U GC-EI-MS bylo zjištěno snížení hodnot LOD a LOQ u isobutylesterů PFCA. Hodnoty LOD se pohybovaly v rozmezí  $0,03 - 0,31 \mu\text{g mL}^{-1}$  oproti LOD hodnotám měřeným pomocí GC-ECD, které se pohybovaly mezi  $0,15$  až  $0,73 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Oproti hodnotám LOD a LOQ naměřeným v prostředí acetonitrilu (viz tabulka 9) došlo k výraznému poklesu limitů detekce a stanovitelnosti pro GC-EI-MS, naopak u GC-



ECD došlo u čtyř ze šesti kyselin k nárůstu LOD a LOQ. Optimalizace derivatizační reakce v prostředí pufru byla prováděna pouze na přístroji GC-EI-MS a jen pro jednu z kyselin – PFOA, u které se podařilo snížit limit detekce stanoveného ve fosfátovém pufru o řád oproti LOD zaznamenaného v prostředí acetonitrilu. Naměřením kalibračních závislostí na GC-ECD se bohužel tento trend zcela nepotvrdil. Další analýzy však byly prováděny na přístroji GC-EI-MS, u kterého byla dosažena nejvyšší citlivost. Vyšší hodnoty LOD a LOQ u GC-EI-MS byly zaznamenány u kyselin s vyšším počtem uhlíků, konkrétně u C<sub>10</sub> – C<sub>12</sub> kyselin, což bylo pravděpodobně způsobeno narůstajícím šumem signálu v průběhu teplotního gradientu během GC analýzy. Nejnížší hodnoty kalibrační řady, tedy 0,02 µg mL<sup>-1</sup>, nebylo možno u těchto látek správně vyhodnotit. Relativní směrodatné odchylky (n = 5) pro hodnoty LOD a LOQ uvedené v tabulce 10 jsou menší než 3 % u GC-ECD a menší než 6.6 % u GC-EI-MS.

Tabulka 10 – Detekční limity (LOD, µg mL<sup>-1</sup>) a limity stanovitelnosti (LOQ, µg mL<sup>-1</sup>) isobutylesterů perfluoralkylkarboxylových kyselin v prostředí fosfátového pufru metodou GC-ECD a GC-EI-MS

	<i><b>GC-ECD</b></i>		<i><b>GC-EI-MS</b></i>	
	<i>LOD</i>	<i>LOQ</i>	<i>LOD</i>	<i>LOQ</i>
PFHxA	-	-	0,15	0,49
PFHpA	0,3	1,1	0,06	0,19
PFOA	0,6	1,9	0,04	0,12
PFNA	0,2	0,5	0,03	0,10
PFDA	0,2	0,5	0,26	0,86
PFUnA	0,5	1,7	0,23	0,77
PFDoA	0,7	2,4	0,31	1,05

#### **4.1.2.4 LOD a LOQ dosažené na GC-NCI-MS**

Byly naměřeny kalibrační závislosti isobutylesterů perfluoralkylkarboxylových kyselin na přístroji GC-NCI-MS v koncentračním rozpětí 0,5 – 1000 ng mL<sup>-1</sup> a vypočteny limity detekce a stanovitelnosti (viz tabulka 11). Pro výpočet LOD a LOQ byly brány hodnoty poměru S/N vždy pro pík dané kyseliny v nejnížší možné naměřené koncentraci (pro PFPeA šlo o koncentraci 40 ng mL<sup>-1</sup>, pro PFHxA, PFHpA a PFOA

8 ng mL<sup>-1</sup> a pro ostatní kyseliny to byla koncentrace 2 ng mL<sup>-1</sup>). Poměr S/N byl vypočítán vždy z nejintenzivnější hodnoty m/z jednotlivých kyselin, což odpovídá m/z = 228 pro PFPeA, 278 pro PFHxA, 328 pro PFHpA atd.

Tabulka 11 – Hodnoty LOD a LOQ (ng mL<sup>-1</sup>) isobutylesterů perfluoralkylkarboxylových kyselin naměřené na GC-NCI-MS

	<i><b>LOD</b></i>	<i><b>LOQ</b></i>	<i><b>RSD (%)</b></i>
PFPeA	9,7	32,2	6,3
PFHxA	2,3	7,5	8,0
PFHpA	1,9	6,3	8,8
PFOA	1,4	4,8	1,4
PFNA	0,05	0,16	0,3
PFDA	0,1	0,4	8,3
PFUnA	0,2	0,6	6,1
PFDoA	0,2	0,6	9,5

Velmi nízké hodnoty limitů detekce a kvantifikace byly zaznamenány u perfluoralkylkarboxylových kyselin s delším řetězcem, řádově desetiny až jednotky ng mL<sup>-1</sup>, tedy ppb. Největší citlivosti bylo dosaženo u PFNA, kde byla zaznamenána hodnota LOD dokonce 0,05 ng mL<sup>-1</sup>. Naopak kyseliny s kratším řetězcem dosahují LOD a LOQ o jeden až dva řády vyšší než delší kyseliny, tedy řádově jednotky až desítky ng mL<sup>-1</sup>. V porovnání s GC-EI-MS a GC-ECD je tento přístroj zhruba o dva až tři řády citlivější.

S takto nízkými hodnotami LOD a LOQ je možné s použitím vhodné prekoncentrační techniky dosáhnout takové citlivosti, kdy lze detekovat a stanovit perfluoralkylkarboxylové kyseliny v reálných vodných vzorcích. Koncentrace PFCA v říčních vodách se pohybují v řádu jednotek či desítek pg mL<sup>-1</sup>, viz kap. 2.2.

#### **4.1.2.5 Srovnání dosažených limitů detekce a stanovitelnosti všech používaných metod**

Z předchozí kapitoly je zřejmé, že nejcitlivějším plynovým chromatografem pro perfluorované analyty je nejnovější přístroj s hmotnostní detekcí a negativní chemickou ionizací. Pro větší názornost jsou v tabulce 12 srovnány dosažené limity

detekce jednotlivých plynových chromatografů přepočítané na shodné jednotky, tedy  $\text{ng mL}^{-1}$ . Isobutylestery perfluoralkylkarboxylových kyselin pro kalibrační závislosti měřené na GC-ECD a GC-EI-MS jsou derivatizované v prostředí fosfátového pufru, isobutylestery perfluoralkylkarboxylových kyselin pro kalibrační závislosti měřené na GC-NCI-MS jsou derivatizované v prostředí acetonitrilu.

Tabulka 12 – Limity detekce a stanovitelnosti ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) isobutylestrů perfluoralkylkarboxylových kyselin na jednotlivých plynových chromatografech

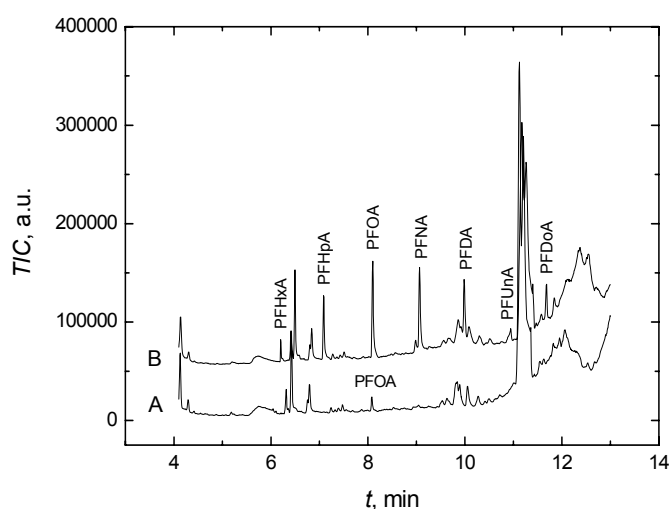
	GC-NCI-MS		GC-ECD		GC-EI-MS	
	<i>LOD</i>	<i>LOQ</i>	<i>LOD</i>	<i>LOQ</i>	<i>LOD</i>	<i>LOQ</i>
PFPeA	9,7	32,2	-	-	-	-
PFHxA	2,3	7,5	-	-	147	489
PFHpA	1,9	6,3	320	1066	57	189
PFOA	1,4	4,8	571	1904	35	118
PFNA	0,05	0,16	156	522	30	99
PFDA	0,1	0,4	154	512	257	855
PFUnA	0,2	0,6	504	1680	232	772
PFDoA	0,2	0,6	725	2417	314	1048

#### 4.1.3 Reálné vzorky

Optimalizovaná metoda derivatizace v prostředí fosfátového pufru byla vyzkoušena na třech reálných vzorcích říční vody metodou přímého zakoncentravání. Tyto vzorky byly měřeny na přístroji GC-EI-MS v době, kdy ještě nebyl k dispozici citlivější GC-MS s negativní chemickou ionizací. Souběžně byl pro kontrolu stejným způsobem jako reálné vzorky zpracován vzorek destilované vody s přidavkem standardu PFOA a s použitím příslušné kalibrační závislosti byla stanovena výtěžnost celého postupu na 64 %. Tato prekoncentrační technika je nejjednodušší možná metoda (bez jakéhokoli přečištění vzorku) a je pouze předběžná. Použití sofistikovanější metody, např. SPE, poskytne s vysokou pravděpodobností lepší výsledky.

U dvou vzorků (Vltava 1, Vltava 3) nebyly žádné z perfluoralkylkarboxylových kyselin detegovány, u vzorku s označením Vltava 2 byl nalezen pík PFOA. Dosazením do kalibrační rovnice byla dopočtena příslušná koncentrace, která odpovídá hodnotě

0,20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ve 200  $\mu\text{L}$  hexanu, resp. 0,22  $\mu\text{g mL}^{-1}$  v 5 ml pufru po zakoncentrování. Tato hodnota se pohybuje nad limitem stanovení metody pro příslušnou perfluoralkylkarboxylovou kyselinu. V původním vzorku Vltava 2 před zakoncentrováním byla stanovena koncentrace 3,4  $\text{ng mL}^{-1}$ . Tato hodnota je ve srovnání s nalezenými koncentracemi PFCA stanovenými později ve vzorcích Vltavy a Labe (viz. kap. 4.2.4) příliš vysoká, proto se jeví jako pravděpodobné, že došlo ke kontaminaci vzorku. Problematika kontaminace je podrobněji pojednána v kapitole 4.2.1. Na obrázku 4.10-A je chromatogram vzorku Vltava 2, ve kterém byl detegován pík PFOA s retenčním časem 8,08 min. Identita PFOA byla ověřena přidavkem standardů PFCA k tomuto vzorku před derivatizací na jejich výslednou koncentraci 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Obr. 4.10-B).



Obrázek 4.10 – Chromatogram vzorku Vltava 2 (A) a vzorku Vltava 2 s přidavkem perfluoralkylkarboxylových kyselin (B) (koncentrace PFCA 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , podmínky měření viz. obrázek 4.2)

## 4.2 Vývoj extrakční a prekoncentrační metody

Z předchozích kapitol je zřejmé, že pro měření reálných vzorků říčních vod se nejlépe hodí přístroj GC-NCI-MS, díky své vysoké citlivosti. Ke stanovení perfluoralkylkarboxylových kyselin v reálných vzorcích bylo ale nutné ještě vyvinout a optimalizovat metodu na přečištění a dostatečné zkoncentrování. Jako pravděpodobně nejvhodnější a nejběžněji používaná metoda se jevila extrakce na tuhé fázi, tzv. SPE.

Byly proto zakoupeny SPE kolonky se stacionární fází hydrofilně modifikovaného polymeru na bázi styrenu, komerčně dostupného pod výrobním názvem Supel<sup>TM</sup>-Select HLB. Dle zpracované rešerše (viz kap. 2.2) byly kolonky s touto stacionární fází, a to buď od firmy Supelco nebo od firmy Waters pod komerčním názvem Oasis<sup>®</sup>, nejčastěji využívány pro extrakci perfluoralkylkarboxylových kyselin z vodných vzorků, proto byly vybrány i pro naši práci. Další kapitoly jsou tedy věnovány optimalizaci této prekoncentrační metody.

#### 4.2.1 Určení zdrojů kontaminace

Na začátku práce byla zjištěna kontaminace slepých vzorků po SPE některými PFCA na úrovni desítek ng. Po důkladném pátrání a vyloučení všech zařízení, která by mohla obsahovat části z fluoropolymerů, byl jako hlavní zdroj kontaminace identifikován SPE manifold, který obsahuje kohouty a těsnění z fluoroplastů. Pro důkaz tohoto tvrzení byly vloženy tyto kohouty z manifoldu včetně těsnění do kádinky s 10 mL methanolu a ponechány v ultrazvukové lázni po dobu 10 minut. Poté byl všechn methanol odpařen, odparek rozpuštěn v acetonitrilu a byla provedena derivatizace jako s ostatními vzorky. GC-NCI-MS analýzou byly stanoveny PFCA v množství 19 ng PFOA, 8 ng PFNA, 9 ng PFDA, 7 ng PFUnA a 6 ng PFDoA. Po prosátí blanku deionizované vody přes SPE kolonku v manifoldu a následným použitím ruční eluce mimo manifold byly slepé vzorky čisté, bez kontaminace perfluoralkylkarboxylovými kyselinami.

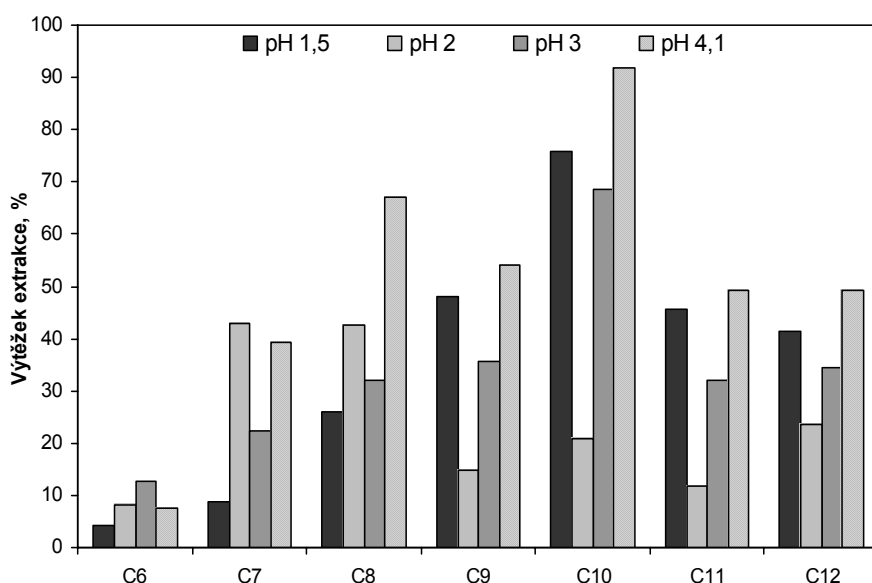
#### 4.2.2 Vývoj SPE metody

Metoda SPE byla vyvíjena s pomocí GC-MS přístroje s elektronovou ionizací. Výchozím bodem pro hledání vhodných podmínek pro SPE metodu byla práce Weremiukové a kol. [37], kdy bez jakékoliv úpravy pH vzorku, byly určeny extrakční účinnosti u roztoků standardů PFCA ( $C_6 - C_{12}$ ) v redestilované vodě o objemu 250 ml a koncentraci  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Bohužel bylo dosaženo mnohem horších extrakčních účinností oproti publikovaným. To mohlo mít několik důvodů. V první řadě byly sice použity SPE kolonky se stejnou náplní, ale od jiného výrobce (Supelco vs. Waters). Rozdíl byl také v postupu po odpaření elučního činidla, kdy jsme použili acetonitril jako rozpouštědlo pro rozpuštění odparku, kdežto Weremiuková a spol. použili směs octanu amonného ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) a acetonitrilu (50:50 obj. %), kterou také používali jako

mobilitní fázi pro následné měření na HPLC-MS/MS. Další možnou příčinou mohlo být také to, že metoda podle Weremiukové byla optimalizována pouze pro PFOA a PFOS, kdežto naše analyty zahrnují homologickou řadu  $C_6 - C_{12}$  kyselin. Účinnost extrakce (recovery) se pohybovala v rozmezí 7 % (PFHxA) – 91 % (PFDA), přičemž se nejhůře extrahovaly kyseliny s kratším řetězcem. U PFOA jsme dosáhli pouze 68% účinnosti, oproti 99 – 100 % účinnosti, které dosáhla Weremiuková ve své práci. Proto jsme přistoupili k modifikaci SPE metody pro naše analyty a prvním krokem byla zvolena optimalizace pH vzorku.

#### 4.2.2.1 Optimalizace pH

Byla připravena série 3 roztoků standardů PFCA o objemu 250 ml o koncentraci  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , kde bylo přidavkem kyseliny fosforečné upraveno pH na hodnoty 1,5, 2,0 a 3,0. Kyselá oblast pH byla zvolena z důvodů snahy o potlačení disociace kyselin ( $pK_a$  2,6 pro PFOA [12]), aby neionizované formy mohly intenzivněji interagovat s náplní SPE kolonek.



Obrázek 4.11 – Závislost výtěžku SPE extrakce perfluoralkylkarboxylových kyselin na pH vzorku [125]

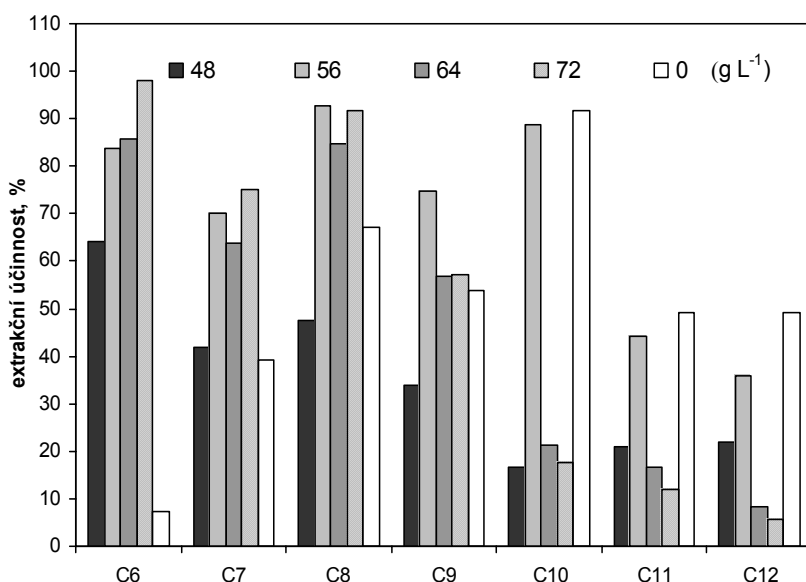
Bohužel úpravy pH nepřinesly výrazné zlepšení výsledků, naopak pokles pH způsobil pokles účinností u jednotlivých kyselin, jak je možné vidět na obrázku 4.11. Nejlepší souhrnné účinnosti bylo dosaženo u původního vzorku, u kterého nebylo pH nijak upravováno (naměřená hodnota pH odpovídala 4,1). Proto pro další optimalizační kroky byly brány vzorky bez úpravy pH.

#### 4.2.2.2 Výběr elučního činidla

Testovanými eluenty byly methanol a acetonitril. Výsledky měření prokázaly, že použití acetonitrilu (ACN) místo methanolu nepřináší žádné výrazné zvýšení měřených hodnot účinnosti. Dále byla vyzkoušena eluce dvojnásobným objemem ACN i methanolu (8 mL), avšak ani tato změna nepřinesla zlepšení, a proto byl dále používán eluční objem 4 mL methanolu.

#### 4.2.2.3 Přídavek NaCl

Je všeobecně známo, že účinnost extrakce lze ovlivnit iontovou silou roztoku vzorku (salting-out, vysolovací efekt). Byla proto připravena série roztoků standardů směsi PFCA o objemu 250 ml a koncentracích  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  s různými koncentracemi NaCl, a to 0, 48, 56, 64 a  $72 \text{ g L}^{-1}$ . Tyto roztoky byly následně podrobeny SPE.



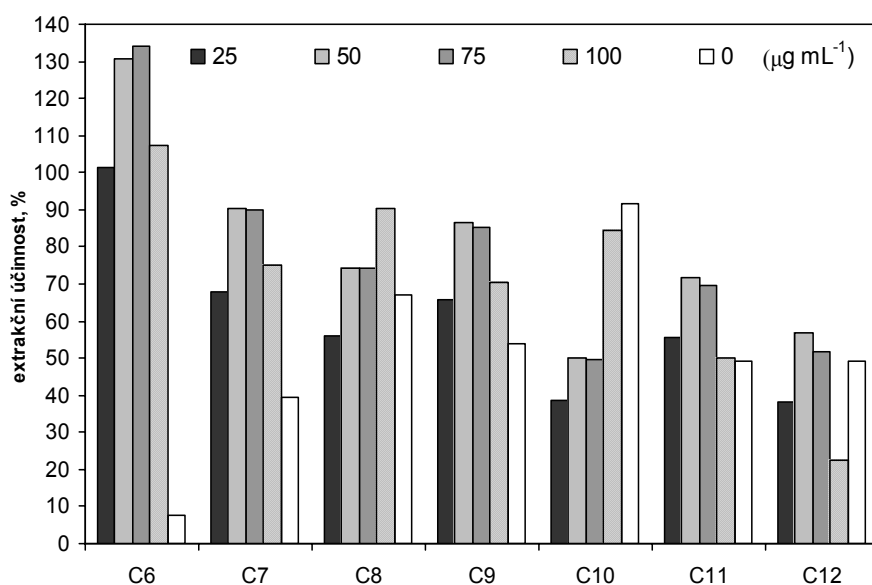
Obrázek 4.12 – Závislost výtěžku extrakce na přídavku NaCl ke vzorku, nulová hodnota je uvedena pro srovnání a představuje původní neupravený roztok o pH = 4,1 [125]

Přídavek soli ke vzorku způsobil nárůst výtěžku při extrakci u kyselin C<sub>6</sub> – C<sub>9</sub>, zatímco u C<sub>10</sub> – C<sub>12</sub> je patrný pokles oproti hodnotám bez přídavku soli. Po vyzkoušení různých přídavků bylo zjištěno, že optimální hodnota přídavku pro celou skupinu PFCA je  $56 \text{ g L}^{-1}$  (viz obr. 4.12). Nevýhodou přídavku NaCl je vzniklý solný odparek, který se téměř nerozpouští v ACN před derivatizačním krokem. Vzniklá suspenze soli v ACN

pak znesnadňuje pipetaci, ale neovlivňuje samotnou derivatizaci.

#### 4.2.2.4 Přídavek iontově-párového činidla

Další z možností jak ovlivnit extrakci, je přidání látky tvořící s analytem iontový pár, v tomto případě byl touto látkou tetrabutylamoniumbromid (TBABr). Přídavkem TBABr dojde ke změně extrahované formy analytu z aniontu na neutrální iontový pár TBA-kyselina. Byla připravena série roztoků standardů PFCA o různé koncentraci TBABr. Do roztoků směsi PFCA o objemu 250 mL o koncentracích  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  jednotlivých kyselin byl přidán TBABr, aby jeho výsledná koncentrace činila 25, 50, 75 a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Tyto roztoky byly podrobeny SPE.



Obrázek 4.13 – Závislost výtěžku SPE extrakce na přídavku tetrabutylamoniumbromidu ke vzorku. Nulový přídavek představuje původní neupravený roztok o  $\text{pH} = 4,1$  [125]

Z obrázku 4.13 je patrné, že největší vzrůst účinnosti SPE se projevil u koncentrací TBABr 50 a  $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ , z nichž byla pro vyrovnanější výsledky v celém souboru vybrána koncentrace  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Nejdramatičtější nárůst účinnosti extrakce lze pozorovat u PFHxA, kde jsou zjištěny hodnoty nad 100 %. Tento efekt nejsme prozatím schopni objasnit. V případě stanovení samotné PFOA je lepší zvolit koncentraci  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  TBABr, neboť v tomto případě je výtěžek SPE nad 90 % oproti 68 %.



#### 4.2.2.5 Kombinace přídavku TBABr a NaCl

Vzhledem k předchozím dobrým výsledkům s přídavky NaCl a TBABr byl posledním krokem test společného přídavku obou látek. Byla proto připravená série roztoků směsi standardů PFCA o koncentraci  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  a objemu 250 mL s fixní koncentrací NaCl  $56 \text{ g mL}^{-1}$  a různou koncentrací TBABr ( $50 - 150 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Předpokládaný nárůst účinnosti SPE při kombinaci obou látek se nepotvrdil a všechny hodnoty byly naopak nižší. Kvůli výše popsaným nevýhodám spojeným s přídavkem soli bylo rozhodnuto zůstat pouze u přídavku TBABr, který poskytoval výtěžky přes 70 % i u kyselin s delšími řetězci.

Původní metoda, kterou používala Weremiuková, byla modifikována pro homologickou řadu PFCA a bylo tak dosaženo zlepšení extrakční účinnosti SPE metody pro  $\text{C}_6 - \text{C}_{12}$  perfluoralkylkarboxylové kyseliny, a to hlavně díky přídavku iontově-párového činidla TBABr. Jako optimální byly vybrány tyto parametry úpravy vzorků před vlastní SPE: žádná úprava pH a přídavek iontově-párového činidla TBABr o koncentraci  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### 4.2.3 Extrakční účinnost u spikovaných vzorků říční vody

Z důvodů vyšší citlivosti byla všechna měření říční vody prováděna na plynovém chromatografu s hmotnostní detekcí a negativní chemickou ionizací. V rámci těchto experimentů byla do souboru analytů dodatečně zahrnuta ještě kyselina perfluorpentanová (PFPeA). Tři vzorky říční vody z Vltavy (odběrová místa A, B a C) byly spikovány směsí perfluoralkylkarboxylových kyselin  $\text{C}_5 - \text{C}_{12}$  na koncentraci 1,40 a  $0,14 \text{ ng mL}^{-1}$ . K těmto spikovaným vzorkům bylo přidáno příslušné množství TBABr, aby jeho celková koncentrace byla  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  a 250 mL takto upraveného vzorku podrobena SPE, eluáty derivatizovány a isobutylestery perfluoralkylkarboxylových kyselin stanoveny metodou GC-NCI-MS. Všechna měření byla provedena ve třech opakováních a výsledky měření spikovaných a nespikovaných vzorků byly vyhodnoceny na základě příslušných kalibrací jednotlivých kyselin a byly určeny hodnoty účinnosti SPE (tabulka 13).

Tabulka 13 – Účinnosti SPE pro jednotlivé perfluoralkylkarboxylové kyseliny ve spikovaných vzorcích říční vody z Vltavy

	<i>Spikovaná hladina 1,40 ng mL<sup>-1</sup></i>		<i>Spikovaná hladina 0,14 ng mL<sup>-1</sup></i>	
	<i>Recovery (%)</i>	<i>RSD %</i>	<i>Recovery (%)</i>	<i>RSD %</i>
PFPeA	102	7	99	4
PFHxA	100	6	111	6
PFHpA	98	5	100	5
PFOA	104	6	103	6
PFNA	86	10	66	3
PFDA	79	6	67	1
PFUnA	65	5	60	4
PFDoA	60	3	53	10

Hodnoty účinnosti SPE se pohybují od 53 do 111 % přičemž lze pozorovat stejnou tendenci, kdy PFCA s kratším řetězcem, C<sub>5</sub> – C<sub>8</sub>, vykazují prakticky 100 % účinnost pro obě hodnoty koncentrací, zatímco kyseliny s delším řetězcem, C<sub>9</sub> – C<sub>12</sub>, vykazují účinnost pod 86 % (srovnej obrázek 4.13 a tabulku 13). Oboustranný t-test ( $\alpha = 0,05$ ,  $n = 3$ ) prokázal, že hodnoty účinností pro obě koncentrační hladiny se statisticky neliší pro všechny PFCA. Výsledky pro PFPeA a PFHxA rovněž ukázaly, že u takto nízkých koncentrací nenastává problém s hodnotami účinnosti SPE výrazně nad 100 %. Hodnoty účinnosti SPE dosažené během hledání vhodných podmínek pro roztoky standardů v destilované vodě nelze přímo srovnávat s výsledky pro říční vodu, protože se výrazně liší podmínky jejich měření (rozdílné přístroje, kalibrační závislosti, koncentrační hladiny spikování a matrice vzorků). Pro určení koncentrací PFCA u reálných vzorků řek byly zahrnuty hodnoty účinnosti SPE jednotlivých kyselin, získané z nižší spikované hladiny, 0,14 ng mL<sup>-1</sup>, která je blíže reálným koncentracím vyskytujícím se ve vzorcích vod.

#### 4.2.4 Reálné vzorky říčních vod

##### 4.2.4.1 Vzorky Vltavy

Výsledky vzorků vltavské vody odebírané na třech místech v Praze během 3 měsíců jsou znázorněny v tabulce 14.

Tabulka 14 – Koncentrace PFCA (v  $\text{pg mL}^{-1}$ ) ve vzorcích říční vody z Vltavy, odebraných na třech místech v Praze

<i>Koncentrace PFCA (<math>\text{pg mL}^{-1}</math>) ve vzorcích Vltavy</i>									
	<i>7. listopad 2010</i>			<i>9. prosinec 2010</i>			<i>4. leden 2011</i>		
	<i>A Výtoň</i>	<i>B Nad ÚČOV</i>	<i>C Pod ÚČOV</i>	<i>A Výtoň</i>	<i>B Nad ÚČOV</i>	<i>C Pod ÚČOV</i>	<i>A Výtoň</i>	<i>B Nad ÚČOV</i>	<i>C Pod ÚČOV</i>
PFPeA	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
PFHxA	< LOD	298 (9)	51 (20)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
PFHpA	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOQ	< LOD	< LOQ	< LOD
PFOA	28 (6)	19 (13)	24 (14)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
PFNA	3 (18)	4 (14)	2 (4)	1 (12)	2 (8)	3 (1)	2 (14)	1 (14)	2 (1)
PFDA	12 (38)	< LOD	< LOD	5 (35)	4 (21)	4 (18)	< LOD	< LOD	< LOD
PFUnA	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	7 (19)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
PFDoA	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	9 (15)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

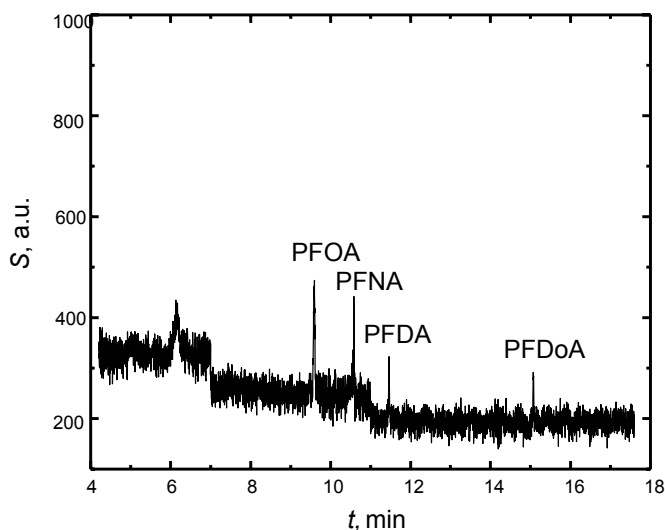
Hodnoty v závorkách reprezentují relativní směrodatnou odchylku v %, ÚČOV – Ústřední čistírna odpadních vod

Ve všech vzorcích byla nalezena PFOA v koncentračním rozpětí 4 (LOD) – 28  $\text{pg mL}^{-1}$  a PFNA v rozpětí 1 – 4  $\text{pg mL}^{-1}$ . Nebyl pozorován nárůst PFCA ve vzorcích pod ÚČOV v Praze, což znamená, že pražské odpadní vody pravděpodobně nebyly zdrojem kontaminace perfluoralkylkarboxylovými kyselinami v době odběru vzorků.

Vezmeme-li průměrnou koncentraci z míst A, B a C pro daný čas odběru, lze snadno spočítat, že průměrný hmotový tok PFOA Vltavou představoval hodnoty 2,5  $\text{mg s}^{-1}$  7. listopadu 2010, 1,1  $\text{mg s}^{-1}$  9. prosince 2011 a 1,3  $\text{mg s}^{-1}$  4. ledna 2011. Zajímavý je výsledek z listopadového odběru, kde byly nalezeny vysoké koncentrace PFHxA, zvláště pak nad ÚČOV, kde byla zjištěna koncentrace 298  $\text{pg mL}^{-1}$ . Tento výsledek se shodoval ve všech 3 vzorcích připravených z tohoto odběrového místa, čímž se dá vyloučit případná kontaminace při procesu zpracovávání a analýzy vzorků. Pod ÚČOV už byla koncentrace PFHxA jen 51  $\text{pg mL}^{-1}$ . Tento ojedinělý výskyt ukazuje, že případná kontaminace PFCA může mít velmi nepravidelné výskyty, což velmi ztěžuje odhalení jejich původu. V listopadovém odběru jsou také zaznamenány nejvyšší koncentrace PFOA a PFNA, což bylo pravděpodobně způsobeno tím, že voda nebyla

zředěna vodou z tajícího sněhu, tak jako tomu bylo v prosinci a v lednu. Četnosti výskytu PFCA v devíti vzorcích se rovnají 0 % pro PFPeA, 22 % pro PHHxA a PFHpA, 100 % pro PFOA a PFNA, 44 % pro PFDA a po 11 % pro PFUnA a PFDoA.

Vysoké relativní směrodatné odchylky u některých analytů byly zapříčiněny rozdíly v automatické softwarové integraci píků analytů, jejichž koncentrace se pohybovaly těsně nad mezí stanovitelnosti. Všechny změřené blanky byly čisté a bez kontaminace. Příklad chromatogramu reálného vzorku je uveden na obrázku 4.14.



Obrázek 4.14 – GC-NCI-MS chromatogram vzorku říční vody z Vltavy odebraného na místě A (Výtoň) v listopadu 2010

#### 4.2.4.2 Vzorky Labe

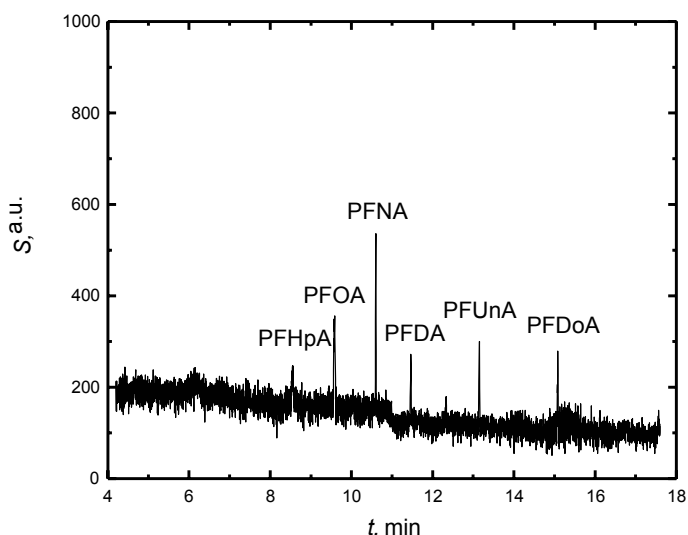
Vzorky říční vody z Labe byly odebrány dne 8.1.2011 podél celého toku na 6 odběrových místech. Byly zpracovávány stejným způsobem jako vzorky Vltavy. Stejně jako ve Vltavě, u všech vzorků Labe byla nalezena přítomnost PFOA v koncentracích mezi 4 (LOD) a 17  $\text{pg mL}^{-1}$  a PFNA v rozsahu 0,1 – 3  $\text{pg mL}^{-1}$ . Navíc byla ve všech vzorcích přítomna PFDA v rozsahu 1 – 10  $\text{pg mL}^{-1}$ . Četnosti výskytu zbylých PFCA jsou 0 % pro PFPeA, 17 % pro PFHxA, 67 % pro PFHpA a PFUnA, 83 % pro PFDoA. Hodnota 17,1  $\text{pg mL}^{-1}$  je také nejvyšší zjištěnou koncentrací PFOA ve vzorcích Labe, a to v Děčíně, kde odtéká Labe z České republiky a vstupuje do Německa. Obdobně jako u vzorků Vltavy je zřejmý nízký výskyt PFCA s kratším řetězcem. Naopak, překvapivě vysoké koncentrace  $\text{C}_9 - \text{C}_{12}$  PFCA byly nalezeny

ve vzorcích odebraných na horním toku Labe ve Vrchlabí, které se nachází na jižním okraji Krkonošského národního parku. Dále podél toku Labe koncentrace všech PFCA klesly na hodnoty řádově jednotek  $\text{pg mL}^{-1}$  a méně (mimo PFOA). Ze získaných dat se nedá potvrdit skutečnost, že by koncentrace PFCA stoupaly podél říčního toku s růstem hustoty průmyslových podniků. Chyby měření jsou v některých případech poměrně vysoké, a to ze stejného důvodu, který byl zmíněn u vzorků Vltavy. Dalším důvodem je také to, že se během přípravy vzorků Labe vyskytovala ve větší míře kontaminace (konkrétně  $\text{C}_9 - \text{C}_{12}$ ) blanků i přes důkladné vymývání veškerého použitého nádobí methanolem. Pro zpracování výsledků bylo proto nutno některá měření vyloučit. U některých hodnot není tudíž uvedena hodnota RSD, protože v těchto případech musela být brána pouze jedna naměřená hodnota. Příklad chromatogramu reálného vzorku vody Labe je uveden na obrázku 4.15.

Tabulka 15 – Koncentrace PFCA (v  $\text{pg mL}^{-1}$ ) ve vzorcích říční vody z Labe, odebraných 8.1.2011 na šesti místech podél celého toku

	<i>Koncentrace PFCA (<math>\text{pg mL}^{-1}</math>) ve vzorcích Labe</i>					
	<i>Vrchlabí</i>	<i>Pardubice</i>	<i>Kly</i>	<i>Štětí</i>	<i>Ústí nad Labem</i>	<i>Děčín</i>
PFPeA	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
PFHxA	< LOD	< LOD	< LOQ	< LOD	< LOD	< LOD
PFHpA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOD	< LOD	< LOQ
PFOA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	12 (-)	< LOQ	17 (15)
PFNA	2 (19)	< LOQ	1 (-)	3 (25)	0.4 (14)	2 (27)
PFDA	4 (39)	4 (27)	2 (33)	5 (-)	1 (29)	10 (25)
PFUnA	6 (-)	< LOQ	< LOD	< LOD	< LOQ	3 (32)
PFDoA	14 (9)	< LOD	7 (32)	4 (8)	5 (-)	11 (2)

Hodnoty v závorkách reprezentují relativní směrodatnou odchylku v %



Obr. 4.15 – GC-NCI-MS chromatogram vzorku říční vody z Labe odebraného v Děčíně dne 8.1.2011

#### 4.2.4.3 Shrnutí aplikace metody na říční vzorky

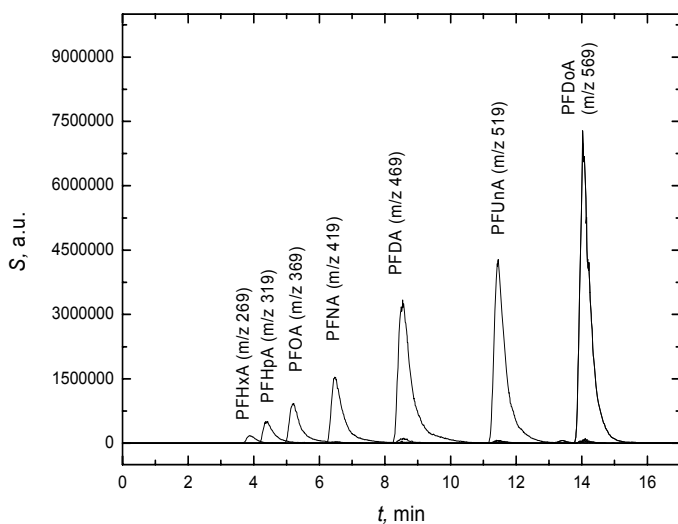
V rámci měření v oblastech jednotek  $\text{pg mL}^{-1}$ , ve které se pohybujeme, je velmi obtížné zcela zabránit kontaminaci vzorků perfluorovanými látkami, protože jakýkoliv kontakt s teflonovými součástkami může ovlivnit měření. I přes naši velkou snahu se nepodařilo kontaminaci úplně eliminovat a bude nutné na tomto finálním kroku ještě zapracovat. Naše výsledky mají představovat pouze ověření, zda daná metoda je použitelná a dostatečně citlivá, nejedná se primárně o monitoring PFCA ve vzorcích životního prostředí ČR. Pokud se ale povede kontaminaci zcela odbourat a případně připravovat a prokládat měření větším množstvím kontrolních blanků, je tato metoda jednoznačně použitelná pro monitoring perfluoralkylkarboxylových kyselin ve vzorcích povrchové vody. To dokazuje také to, že námi nalezené hodnoty jsou řádově srovnatelné s publikovanými hodnotami evropských řek [83-87].

### 4.3 Separace PFCA vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí

Vedle plynové chromatografie byla další separační technikou, používanou během naší práce, vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí. Zde byla navázána spolupráce s RNDr. Martinem Štíchou z Katedry organické a jaderné chemie PřF UK, který pomohl změřit a vyhodnotit naměřené výsledky. Výhodou

kapalinové chromatografie, stejně jako kapilární elektroforézy je fakt, že není nutné provádět derivatizaci, ale měří se přímo směs perfluoralkylových karboxylových kyselin.

Měření na přístroji HPLC-MS s negativní elektrosprejovou ionizací mělo pouze orientační význam, aby bylo možno srovnat separaci a limity detekce s výsledky dosaženými pomocí plynové chromatografie a kapilární elektroforézy. Byla provedena pouze optimalizace mobilní fáze a průtoku mobilní fáze, dalším optimalizačním krokům nebyla věnována přílišná pozornost. Dosažené limity detekce se pohybovaly v rozmezí  $1,7 - 3,4 \mu\text{g mL}^{-1}$  a limity stanovitelnosti v rozmezí  $1,1 - 10,1 \mu\text{g mL}^{-1}$  pro homologickou řadu PFCA. Hodnoty LOD a LOQ pro jednotlivé PFCA jsou zpracovány v tabulce 17 v kapitole 4.4.3, kde jsou porovnány s ostatními separačními technikami. Na obrázku 4.16 je zobrazena separace homologické řady perfluoralkylkarboxylových kyselin s délkou řetězce  $\text{C}_6 - \text{C}_{12}$ .



Obr. 4.16 – HPLC-ESI(-)-MS chromatogram směsi perfluoralkylkarboxylových kyselin, složení mobilní fáze: acetonitril, voda a octan amonný ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 3,6$ ) s poměrem 55 : 15 : 30, průtoková rychlost  $0,22 \text{ mL min}^{-1}$

#### 4.4 Separace PFCA kapilární zónovou elektroforézou s hmotnostní detekcí

Poslední separační technikou, která byla v této práci použita, byla kapilární zónová elektroforéza ve spojení s hmotnostním detektorem. Cílem bylo vyvinout a

optimalizovat metodu stanovení PFCA, srovnat tuto techniku s ostatními separačními metodami a aplikovat tuto metodu na reálné vodné vzorky. Tato část práce byla vypracovávána na Katedře analytické chemie, senzorů a biosenzorů Univerzity v Regensburgu, Německo. Homologická řada standardů PFCA byla ještě pro tuto část práce rozšířena o kyselinu perfluortridekanovou (PFTrA) a kyselinu perfluortetradekanovou (PFTeA).

#### **4.4.1 Optimalizace CE-MS separace ve vodném elektrolytu**

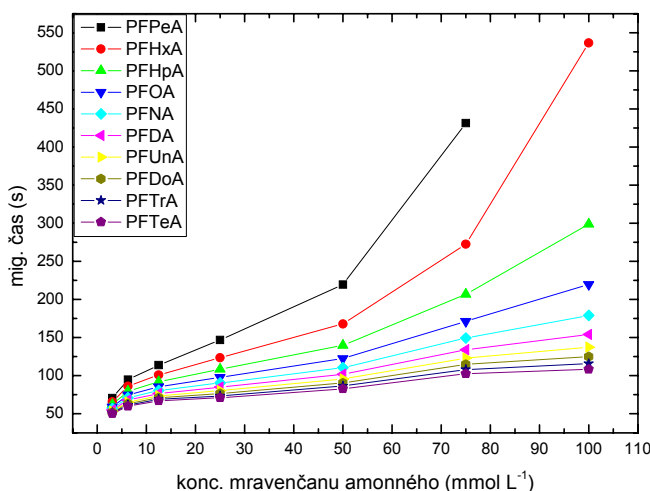
##### **4.4.1.1 Optimalizace složení elektrolytu**

Z informací čerpaných z publikací od Wójcikové a kol. [105,106] vyplývá, že úspěšně by měla separace probíhat v zásaditějším pufru kolem  $\text{pH} = 9$  a s vyšším obsahem organického rozpouštědla. V těchto publikacích byly vyzkoušeny pufrы Tris a fosfátový pufr s přidavkem isopropanolu a methanolu. V jejich případě však bylo použito přímé či nepřímé UV či fotometrické detekce. Ani jeden z těchto pufrů však není vhodný pro hmotnostní detektor, proto bylo nutné vyzkoušet zcela jiný typ elektrolytu. Nakonec byly vybrány a připraveny dva druhy vodného elektrolytu – octan amonný a mravenčan amonný o koncentraci  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  a o různých  $\text{pH}$  v rozmezí 5 až 10. Po prvních předběžných měřeních se lépe jevil mravenčan amonný, zřejmě také díky své vyšší těkavosti. Dále byly vyzkoušeny různé hodnoty  $\text{pH}$  u tohoto pufru v rozmezí 6 až 10, nejlepší výsledky byly dosaženy u  $\text{pH} = 9$ , tím se potvrdily předpoklady čerpané z literatury. Analýzy byly ovšem za těchto podmínek velmi dlouhé, cca 25 minut, bereme-li v potaz, že se jedná o separaci na poměrně krátké kapiláře o délce 28 cm. K pufru bylo proto nutno přidat organické rozpouštědlo. Byla vyzkoušena 3 rozpouštědla – methanol, isopropanol a acetonitril. S přidavkem methanolu (50 % v/v) byly analýzy stále velmi dlouhé, cca 20 minut a píky značně rozmyté. Po přidavku isopropanolu (50 % v/v) k vodnému pufru mravenčanu amonného došlo k posunu migračních časů a zkrácení doby analýzy na 7 minut. Nejlepší výsledky ale byly dosaženy po přidavku acetonitrilu (50 % v/v), kdy separace trvala pouhé 4 minuty. Podrobnější optimalizace přidavku acetonitrilu k elektrolytu je dále v kapitole 4.4.1.3. Vzorek byl ze zásobního roztoku o koncentraci  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  v methanolu naředěn na požadovanou koncentraci  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  vodou.



#### 4.4.1.2 Optimalizace koncentrace mravenčanu amonného

Jak se ukázalo, bylo pro separaci výhodnější pracovat se zředěnějším pufrům, než byl připravený mravenčanu amonný o koncentraci  $100 \text{ mmol L}^{-1}$ , proto dalším krokem bylo testování nižších koncentrací mravenčanu amonného v elektrolytu. Závislost migračních časů jednotlivých perfluoralkylkarboxylových kyselin na přidané koncentraci mravenčanu amonného do elektrolytu je graficky znázorněna na obrázku 4.17.



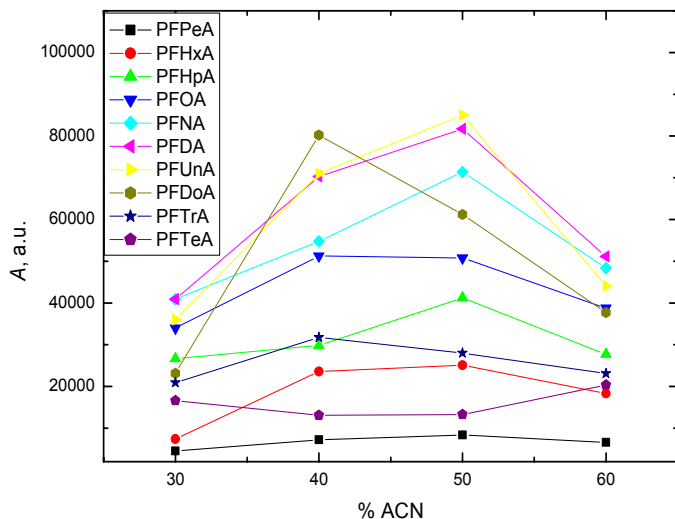
Obrázek 4.17 – Závislost migračních časů PFCA na koncentraci mravenčanu amonného ve vodném elektrolytu (složení elektrolytu: vodný roztok mravenčanu amonného o koncentracích 3,1 – 100  $\text{mmol L}^{-1}$  a  $\text{pH} = 9,0$  + acetonitril 50 % v/v)

Pufr mravenčanu amonného byl postupně ředěn a proměřen v koncentračním rozpětí 3,1 až 100  $\text{mmol L}^{-1}$ . Jako optimální byla vybrána koncentrace 6,25  $\text{mmol L}^{-1}$ , díky velmi rychlé separaci do dvou minut a zároveň dobrému rozlišení jednotlivých píků. Tato závislost byla měřena při maximálním možném napětí, tedy 35 kV a proud se při těchto koncentracích pohyboval v rozmezí 29,4 až 0,7  $\mu\text{A}$ . Při optimální koncentraci 6,25  $\text{mmol L}^{-1}$  odpovídal proud hodnotě 1,5  $\mu\text{A}$ . U mravenčanu amonného bylo při této koncentraci také znovu přeměřeno pH, které se ředěním posunulo na 8,6. Byla proto připravena série pufrů s různým pH v rozpětí 7,5 – 10,0. Jako optimální opět vyšel pufr o  $\text{pH} = 9,0$  i když v důsledku přidávání vysokého obsahu acetonitrilu do pufru byly rozdíly mezi jednotlivými pufrů o různém pH téměř zanedbatelné. K posunu migračních časů docházelo v případě, že se nepodařilo nastavit přesné pH pouze malým přídatkem amoniaku. Dalším přídatkem amoniaku a kyseliny mravenčí, které byly pro adjustaci

pH používány, docházelo k zvýšení koncentrace mravenčanu amonného, které mělo za následek prodloužení analýzy. Důkazem byl také nárůst měřícího proudu, který v těchto případech vzrostl z 1,5  $\mu\text{A}$  až na 7,9  $\mu\text{A}$ .

#### 4.4.1.3 Optimalizace přídavku acetonitrilu do elektrolytu

Dalším krokem optimalizace elektrolytu by přídavek organického rozpouštědla – acetonitrilu.



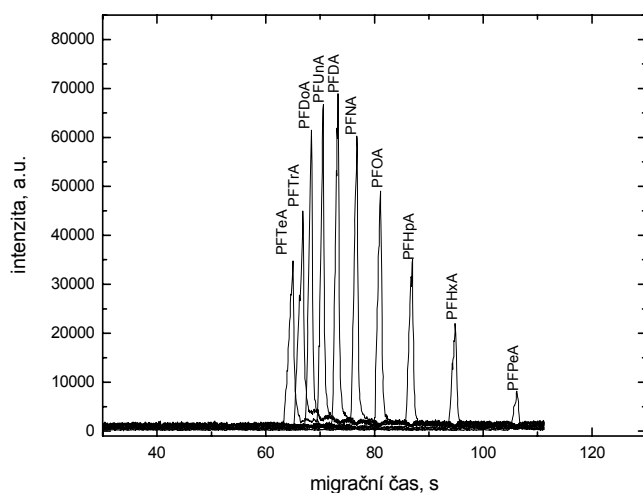
Obrázek 4.18 – Závislost plochy píků PFCA na obsahu acetonitrilu ve vodném elektrolytu (složení elektrolytu: vodný roztok mravenčanu amonného o koncentraci 6,25  $\text{mmol L}^{-1}$  a  $\text{pH} = 9,0$  + acetonitril 30 – 60 % v/v)

Porovnáním ploch píků u jednotlivých měření bylo zjištěno, že nejlepší výsledky poskytuje přídavek 40 - 50 % acetonitrilu. U PFDoA a PFTrA poskytoval přídavek 40 % acetonitrilu největší píky, pro ostatní kyseliny pak byly největší píky zaznamenány při přídavku 50 % acetonitrilu. Kvůli lepší separaci, menšímu šumu a lepší symetrii píků byl nakonec vybrán jako optimální přídavek 50 % acetonitrilu k elektrolytu.

Finální složení vodného elektrolytu mělo tedy toto složení: mravenčan amonný o koncentraci 6,25  $\text{mmol L}^{-1}$  a  $\text{pH} = 9$  s 50 % acetonitrilu (v/v). Za těchto optimalizovaných podmínek byl ještě znovu vyzkoušen octan amonný, ale výsledky byly téměř totožné s mravenčanem amonným, jen symetrie píků byla trochu horší, proto byl nadále jako optimální brán pufr připravený z mravenčanu amonného.

Nevýhodou vodného pufru byl fakt, že nebylo možno měřit analyty společně s EOF markrem. Jako EOF marker byl vybrán kofein, který ale oproti předpokladu nebyl ionizován v negativní elektrosprejové ionizaci. Kofein bylo možno měřit pouze v pozitivním módu se sledovanou hodnotu  $m/z = 195$ . Výhodou TOF analyzátoru je možnost přepínání mezi pozitivním a negativním módem během jedné analýzy, ale přechod trvá cca 25 s, kdy nejsou zaznamenávána data. V případě našich analýz ve vodném pufru byl rozdíl migračních časů mezi kofeinem a prvním analytem, tedy PFTeA, pouhých 18 s. Tak bychom přišli o některé analyty. Během analýzy sice docházelo k slabému poklesu signálu (TIC) v místě migračního času kofeinu, ale nebylo to dostatečně průkazné. V tomto pufru tedy nebylo možno určit elektroferotické mobility, které se vypočítávají na základě rozdílu migračních časů analytu a EOF markeru. Tento problém byl vyřešen v nevodném elektrolytu, viz dále kap. 4.4.2.

Na obrázku 4.19 je zaznamenám elektroferogram směsi perfluoralkylkarboxylových kyselin ve vodném pufru.



Obrázek 4.19 – Elektroferogram směsi perfluoralkylkarboxylových kyselin ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Separace ve vodném pufru o složení: mravenčan amonný ( $6,25 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 9,0$ ) s 50% acetonitrilem (v/v), napětí 35 kV, proud  $1,5 \mu\text{A}$ , dávkovací čas 10 s

#### 4.4.2 Optimalizace CE-MS separace v nevodném elektrolytu

V kapilární elektroforéze s hmotnostním detektorem je občas dosaženo lepší citlivosti, pokud se místo vodného pufru použije čistě nevodný organický elektrolyt. Proto byly vyzkoušeny 2 nevodné pufrы o tomto složení:  $1 \text{ mol L}^{-1}$  kyselina mravenčí

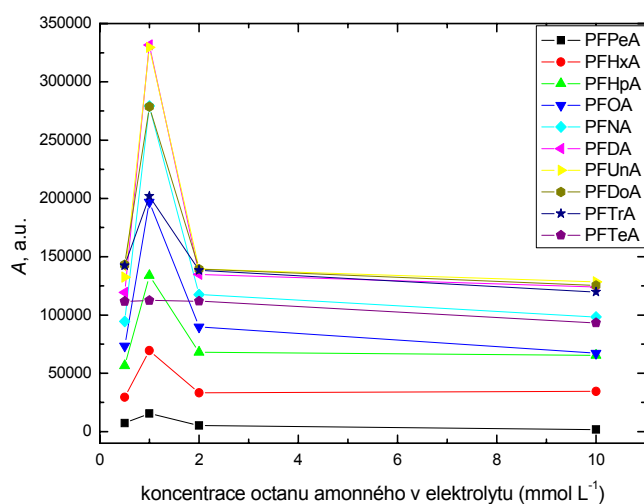
s 10 mmol L<sup>-1</sup> mravenčanem amonným v acetonitilu a 1 mol L<sup>-1</sup> kyselina octová s 10 mmol L<sup>-1</sup> octanem amonným v acetonitilu.

Po otestování obou elektrolytů byl upřednostněn pufr kyselina octová – octan amonný. Píky u pufru kyselina mravenčí – mravenčan amonný byly více rozmyté. Proto byl dále optimalizován jen pufr kyselina octová – octan amonný.

Zásobní roztoky perfluoralkylkarboxylových kyselin připravené v methanolu byly dále ředěny na požadovanou koncentraci (100 μmol L<sup>-1</sup>) acetonitrilem. Byly také vyzkoušeny vzorky naředěné vodou a elektrolytem. U vzorku ředěného vodou nedocházelo k separaci, všechny píky navzájem koeluovaly. U vzorku ředěného elektrolytem docházelo k podobné separaci jako v případě ředění acetonitrilem, ale píky byly menší. Proto bylo dále měřeno výhradně se vzorky ředěnými acetonitrilem.

#### 4.4.2.1 Optimalizace koncentrace octanu amonného

Prvním krokem optimalizace bylo nalezení nejvhodnější koncentrace octanu amonného v elektrolytu. Ukázalo se totiž, že tato koncentrace je pravděpodobně příliš vysoká. Při této koncentraci protékal kapilárou proud odpovídající hodnotě 2,2 μA. Při předchozích měření ve vodném elektrolytu bylo zjištěno, že lepších výsledků bylo dosaženo při nižších proudech. Proto byla snižována koncentrace octanu amonného a tím také klesal proud.

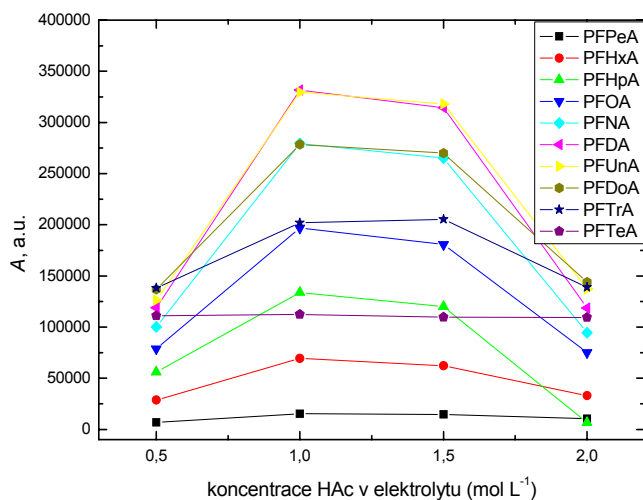


Obrázek 4.20 – Závislost plochy píků PFCA na koncentraci octanu amonného v elektrolytu

Jak je patrné z obrázku 4.20, při použití  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  octanu amonného není dosaženo velké citlivosti. Koncentrace byla postupně snižována a optima bylo dosaženo při přidavku  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  octanu amonného. Při koncentraci  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  protékal elektrolytem téměř nulový proud a došlo k rapidnímu poklesu intenzit. U optimální koncentrace protékal proud odpovídající hodnotě  $0,6 \mu\text{A}$ . Jedině u PFTeA se výrazně neprojevila změna koncentrace, u ostatních kyselin došlo k výraznému nárůstu ploch píků při optimální koncentraci  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ .

#### 4.4.2.2 Optimalizace koncentrace kyseliny octové

Dalším krokem optimalizace složení nevodného elektrolytu bylo nalezení optimální koncentrace kyseliny octové. Proměřeno bylo koncentrační rozpětí od  $0,5$  do  $2 \text{ mol L}^{-1}$ .



Obrázek 4.21 – Závislost plochy píků PFCA na koncentraci kyseliny octové v elektrolytu

Z obrázku 4.21 je patrné, že maximální plochy téměř všech píků byly dosaženy u koncentrace  $1 \text{ mol L}^{-1}$ , tedy u výchozí koncentrace. U kyselin PFPeA a PFTeA, tedy u látek s nejkratším a nejdelším řetězcem, měla změna koncentrace kyseliny octové jen malý vliv na plochy píků. U PFTTrA byla maximální koncentrace zaznamenána u koncentrace  $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ . Jako optimální byla ale zachována koncentrace kyseliny octové  $1 \text{ mol L}^{-1}$ , při které je dosahováno nejintenzivnějších píků většiny PFCA.

Pro měření kalibračních závislostí byl tedy vybrán nevodný elektrolyt o složení  $1 \text{ mol L}^{-1}$  kyselina octová s  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  octanem amonným v acetonitrilu. Kalibrační závislosti byly proměřeny v koncentračním rozpětí  $0,5 - 100 \mu\text{mol L}^{-1}$ , limity detekce a

stanovitelnosti (viz tabulka 16) byly vypočítány z poměru S/N při koncentraci, kdy byly píky významně odlišné od šumu (pro PFPeA se jednalo o koncentraci 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , pro PFHxA 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , pro PFHpA 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  a pro ostatní byly LOD a LOQ vypočítány z koncentrace 0,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ).

Po proměření kofeinu v pozitivní ionizaci bylo zjištěno, že odstup mezi migračními časy kofeinu a PFCA je dostatečně velký, aby bylo možno přepínat mezi jednotlivými ionizačními módy během analýzy. Tím byl vyřešen problém s EOF markerem a bylo možno vypočítat efektivní elektroforetické mobility jednotlivých perfluoralkylkarboxylových kyselin (viz tabulka 16).

Tabulka 16 – Migrační časy, efektivní elektroforetické pohyblivosti, LOD a LOQ perfluoralkylkarboxylových kyselin v nevodném elektrolytu o složení: 1 mol  $\text{L}^{-1}$  kyselina octová a 1 mmol  $\text{L}^{-1}$  octan amonný v acetonitrilu

	$t_{\text{mig}} \text{ (s)}$	<i>Efektivní pohyblivost*</i> ( $10^{-3} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	<i>LOD</i> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	<i>LOQ</i> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
PFPeA	151,0	-0,63 (3,4 %)	1,62	5,39
PFHxA	131,1	-0,61 (3,4 %)	0,40	1,34
PFHpA	117,2	-0,58 (3,5 %)	0,28	0,92
PFOA	107,0	-0,57 (3,6 %)	0,25	0,85
PFNA	99,3	-0,55 (3,7 %)	0,14	0,47
PFDA	93,3	-0,54 (3,7 %)	0,13	0,42
PFUnA	88,5	-0,52 (3,8 %)	0,08	0,26
PFDoA	84,4	-0,51 (3,9 %)	0,16	0,52
PFTTrA	80,7	-0,50 (4,0 %)	0,20	0,66
PFTeA	77,0	-0,48 (4,0 %)	0,44	1,46

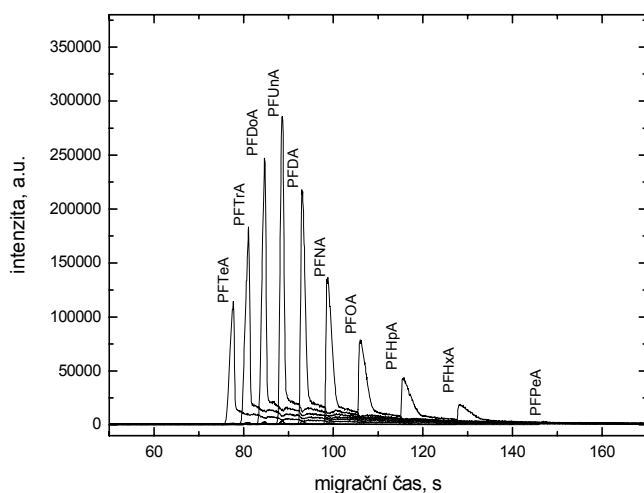
\* v závorce RSD %

Migrační časy perfluorovaných látek se pohybují mezi 1,1 a 2,6 minuty, migrační čas kofeinu (EOF markeru) je 0,5 minuty. Efektivní elektroforetické pohyblivosti byly

vypočítány ze vztahu:  $\mu_{\text{eff}} = \frac{l_d l_c}{U} \left[ \frac{1}{t_{\text{mig}}} - \frac{1}{t_{\text{eof}}} \right]$ , kde  $l_d$  je délka kolony k detektoru,  $l_c$  je

celková délka kolony,  $U$  je vložené napětí,  $t_{mig}$  je migrační čas analytů a  $t_{eof}$  je migrační čas kofeinu. Efektivní elektroforetické mobility nelze porovnat s dalšími naměřenými daty u vodného elektrolytu z důvodu objasněného v kapitole 4.4.1.3. Data publikovaná Wójcikovou a kol. [105,106] jsou dostupná jen pro kyseliny PFHpA a PFNA a to pouze ve vodných pufrch. Srovnání efektivních elektroforetických mobilit tudíž není příliš relevantní.

Na obrázku 4.22 je zaznamenán elektroferogram PFCA v nevodném elektrolytu. Píky sice chvostují, ale jejich intenzity jsou výrazně vyšší, než u ploch píků měřených ve vodném elektrolytu. Píky posledních dvou kyselin, tedy PFHxA a PFPeA jsou značně rozmyté. Byl ještě proveden pokus se změnou složení sheath liquid, který by mohl vést k snížení chvostování a rozmývání píků. Byly vyzkoušeny různé poměry isopropanolu a vody v rozpětí: 90 % isopropanolu a 10 % vody až do poměru 50 % ku 50 %, ale změna nepřinesla zlepšení tvaru píků. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u původně nastaveného poměru 80 % isopropanolu, 20 % vody a 0,2 % kyseliny mravenčí. Kyselina mravenčí byla ještě zaměněna za vodný roztok amoniaku, ale ani to nevedlo k lepším výsledkům. Proto byla i nadále používána sheath liquid o složení isopropanol : voda : kyselina mravenčí (80 : 20 : 0,2).



Obrázek 4.22 – Elektroferogram směsi perfluoralkylkarboxylových kyselin ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Separace v nevodném elektrolytu o složení:  $1 \text{ mol L}^{-1}$  kyselina octová s  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  octanem amonným v acetonitrilu, napětí 35 kV, proud  $0,6 \mu\text{A}$ , dávkovací čas 10 s

#### 4.4.3 Porovnání separace, limitů detekce a stanovitelnosti mezi jednotlivými separačními metodami

Velkou výhodou kapilární elektroforézy jsou velmi krátké doby analýzy, 10 analytů je separováno do 2,6 minut. V porovnání s plynovou chromatografií jde téměř o osminásobné zkrácení doby analýzy. Dalším rozdílem mezi kapilární elektroforézou a plynovou i kapalinovou chromatografií je pořadí analytů při analýze. V chromatografii eluuje homologická řada PFCA od nejkratší po nejdelší kyselinu, u kapilární elektroforézy to je přesně naopak. Ovšem klasické rozložení intenzit jednotlivých píků, kde nejintenzivnější píky s největší plochou jsou uprostřed a krajní píky jsou méně intenzivní, zůstává u obou separačních technik stejné. Nevýhodou CE-MS je horší reprodukovatelnost migračních časů a nižší citlivost pro PFCA. V tabulce 17 je zobrazen přehled dosažených limitů detekce a stanovitelnosti perfluorovaných látek pro jednotlivé separační techniky. Pro snadnější orientaci byly LOD a LOQ přepočítány na stejné jednotky, tedy  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Tabulka 17 – Porovnání hodnot LOD a LOQ ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) pro PFCA dosažených jednotlivými separačními technikami

	<i>GC-NCI-MS</i>		<i>CE-MS</i>		<i>HPLC-MS</i>	
	<i>LOD</i>	<i>LOQ</i>	<i>LOD</i>	<i>LOQ</i>	<i>LOD</i>	<i>LOQ</i>
PFPeA	9,7	32,2	1616	5388	-	-
PFHxA	2,3	7,5	401	1336	3352	1117
PFHpA	1,9	6,3	276	919	2509	8364
PFOA	1,4	4,8	253	845	1791	5971
PFNA	0,05	0,16	141	469	2806	9353
PFDA	0,1	0,4	127	423	3020	10068
PFUnA	0,2	0,6	78	259	1342	4472
PFDoA	0,2	0,6	156	520	1956	6519
PFTTrA	-	-	197	657	-	-
PFTeA	-	-	437	1457	-	-

Jak je vidět z tabulky 17, přístroj GC-NCI-MS je extrémně citlivý pro dané perfluorované látky. Je řádově 100krát až 1000krát citlivější, než ostatní separační



techniky. CE-MS dosahuje citlivosti řádově podobné jako GC-EI-MS a GC-ECD, viz kap. 4.1.2.4, tabulka 10. Nízká citlivost u HPLC-MS byla pravděpodobně způsobena nedostatečnou optimalizací všech měřících podmínek.

#### 4.4.4 Reálné vzorky Dunaje

Ačkoli není metoda CE-MS dostatečně citlivá pro měření stopových koncentrací v reálných vzorcích, bylo rozhodnuto, že budou reálné vzorky touto metodou stejně testovány, aby byla vyvrácena možnost případné nekompatibility metody s matricí.

Byly proto odebrány vzorky Dunaje v centru Regensburgu, Německo. Přefiltrovaná voda byla zpracována stejně jako vzorky Vltavy a Labe (viz kap. 4.2.4), tedy s použitím již zoptimalizované metody SPE. Byly připraveny 2 sety po třech vzorcích a jeden vzorek deionizované vody jako blanku. První set byl připraven bez jakéhokoli spikování, druhá sada byla naspikována směsí 10 perfluoralkylkarboxylových kyselin ( $C_5 - C_{14}$ ) na koncentraci  $50 \text{ nmol L}^{-1}$  ve 250 mL vzorku. Po provedení SPE metody, eluci methanolem a jeho následným odpařením do sucha byl odparek rozpuštěn ve 250  $\mu\text{L}$  acetonitrilu, tedy výsledná teoretická koncentrace v rozpouštědle byla  $50 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$  a prekoncentrační faktor byl roven 1000.

Takto připravené vzorky bylo ještě nutno přefiltrovat přes nylonový filtr (Rotilabo Spritzenfilter, průměr 15 mm,  $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ , Roth, Karlsruhe, Německo), protože jinak by mohlo dojít k ucpání kapiláry zbytkem odparku.

Nespikované vzorky byly proměřeny, ale vzhledem k citlivosti přístroje a našim předpokladům nebyla žádná ze stanovovaných kyselin detekována. Elektroferogram nespikovaných vzorků byl v podstatě totožný s elektroferogramem blanku.

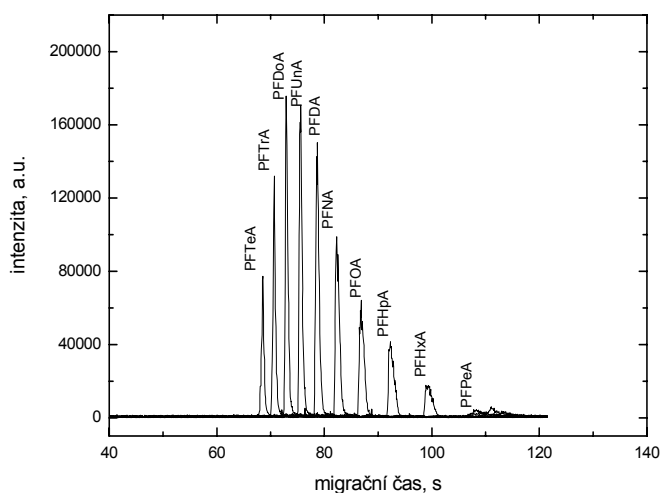
Spikované vzorky byly proměřeny a plochy jednotlivých píků byly porovnávány se standardní směsí PFCA o stejné koncentraci, měřené ten samý den.

Tabulka 18 – Dosažené recovery u spikovaných vzorků Dunaje o koncentraci 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$

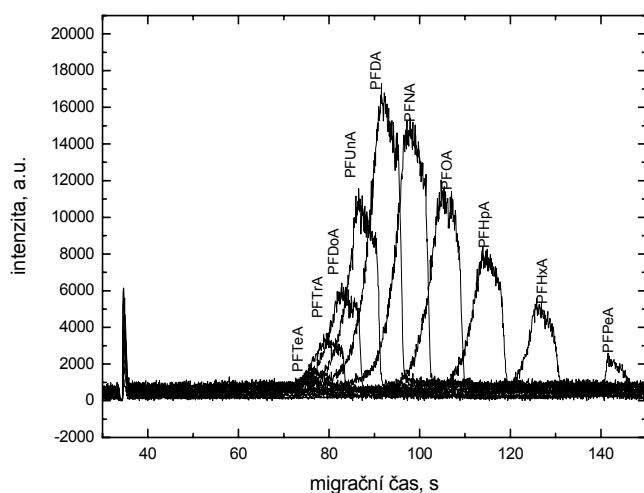
<i><b>Kyselina</b></i>	<i><b>Recovery %</b></i>
PFPeA	35
PFHxA	42
PFHpA	46
PFOA	49
PFNA	48
PFDA	44
PFUnA	29
PFDaA	18
PFTTrA	14
PFTeA	8

RSD pod 8 %

Bohužel porovnáním ploch píků spikovaných reálných vzorků a standardní směsi perfluoralkylkarboxylových kyselin o stejné koncentraci bylo zjištěno, že recovery se pohybuje pouze v rozmezí 8 – 49 %, na rozdíl od očekávaných 60 – 100 %. Na obrázcích 4.23 a 4.24 je porovnání standardní směsi PFCA a spikovaného vzorku Dunaje. Jak je z těchto obrázků patrné, píky v reálném vzorku jsou velmi rozmyté, široké s tupým tvarem bez špičky a frontují. Navíc se výrazně posouvá jejich migrační čas a píky koeluuji. Rozsah osy y musel být v případě obrázku 4.24 desetinásobně zmenšen oproti obrázku 4.23.



Obrázek 4.23 – Elektroferogram standardní směsi perfluoralkylkarboxylových kyselin o koncentraci  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Separace v nevodném pufru o složení:  $1 \text{ mol L}^{-1}$  kyselina octová s  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  octanem amonným v acetonitrilu, napětí 35 kV, proud  $0,6 \mu\text{A}$ , dávkovací čas 3 s



Obrázek 4.24 – Elektroferogram spikovaného reálného vzorku vody z Dunaje naspikovaného směsí PFCA o koncentraci  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Separace v nevodném pufru o složení:  $1 \text{ mol L}^{-1}$  kyselina octová s  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  octanem amonným v acetonitrilu, napětí 35 kV, proud  $0,6 \mu\text{A}$ , dávkovací čas 3 s

Příčinou těchto výsledků je rušení separace maticí, ionizace rušena maticí pravděpodobně není (viz dále). Kolona musela být během měření často proplachována a kondicionována, protože docházelo k postupně narůstajícímu posunu migračních časů analytů a tím samozřejmě k prodlužování doby analýzy a dalšímu rozmývání píků.

Po cca každých 5 – 10 nástřicích reálných vzorků musela být kolona propláchnuta postupně NaOH, vodou, isopropanolem a nakonec elektolytem. Tím se kapilára znovu zkondicionovala a bylo možno na ní opět měřit. Analýzy pak trvaly obvyklou dobu, tedy 3 minuty.

Konstatování, že problém byl v separaci a ne v ionizaci, se dalo potvrdit nařazením vzorku acetonitrilem. Jeden ze spikovaných vzorků byl proto nařazen pětkrát acetonitrilem a výsledkem bylo zúžení píků PFCA a snížení jejich intenzity zhruba pětkrát, čímž se vyloučil vliv matrice na ionizaci. Dalším nápadem, který by mohl vést k zlepšení výsledků, bylo zkrácení nástřikové doby, která byla původně 10 s. S takto dlouhou nástřikovou dobou byla pravděpodobně přetížena kapacita kapiláry, což se u standardní směsi neprojevovalo, ale u reálných vzorků ano. Bylo proto vyzkoušeno zkrácení nástřiku z 10 s postupně na 7 s, 5 s a 3 s. Píky se postupně zužovaly a při krátkém nástřikovém čase 3 s byly už píky krásně úzké a špičaté, bez jakéhokoli zaoblení a rozmývání. Těmito dvěma kroky byl vyloučen vliv matrice na ionizaci a bylo dosaženo zlepšení separace PFCA v reálných vzorcích.

Příčinou problému bylo také zřejmě to, že prekoncentrační faktor 1000 byl příliš vysoký, analyty nebyly dostatečně rozpuštěny v tak malém množství acetonitrilu. Bohužel vzhledem k citlivosti přístroje bychom potřebovali dosáhnout prekoncentračního faktoru minimálně 4000, aby bylo reálné naše analyty v říčních vodách detekovat. Toto bohužel není technicky proveditelné. Nicméně cílem práce bylo potvrdit použitelnost metody pro reálné vzorky, i když jen spikované.

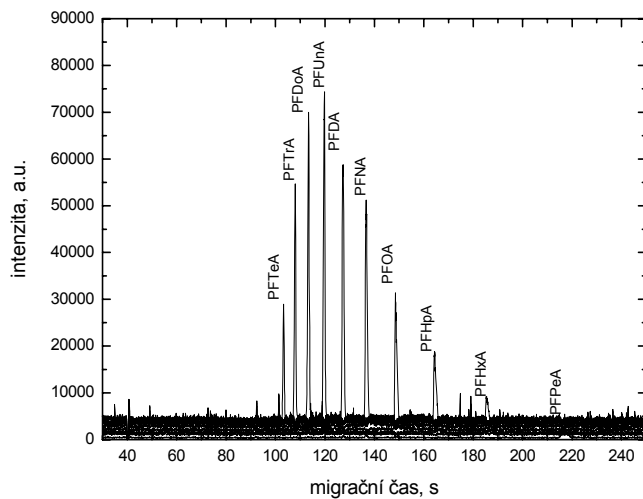
Byla proto připravena další série spikovaných vzorků, tentokrát o koncentraci  $62,5 \text{ nmol L}^{-1}$  ve 250 mL vodného vzorku dunajské vody, u které byla provedena SPE metoda s prekoncentračním faktorem 400, tedy přesně stejně jako při GC-NCI-MS (viz kapitola 3.6), kdy byl odparek rozpuštěn v  $625 \text{ }\mu\text{L}$  acetonitrilu. Výsledná teoretická koncentrace v acetonitrilu tedy měla být  $25 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ . Tyto vzorky byly proměřeny a porovnány se vzorky o stejné koncentraci standardní směsi PFCA, měřenou též den za stejných podmínek. Nástřiková doba 3 s byla použita jak u reálných vzorků, tak i u směsi standardů PFCA. Porovnáním ploch píků bylo vypočteno recovery pro jednotlivé kyseliny.

Tab. 19 – Dosažené recovery u spikovaných vzorků Dunaje o koncentraci  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$

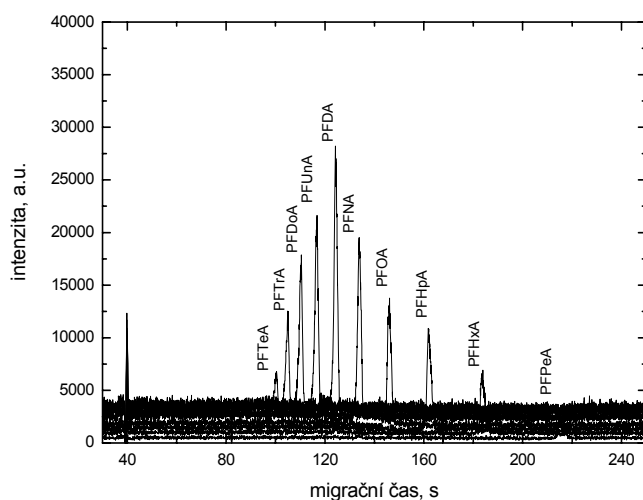
Pořadí migrace	Kyselina	Recovery %
10	PFPeA	105
9	PFHxA	105
8	PFHpA	89
7	PFOA	86
6	PFNA	77
5	PFDA	85
4	PFUnA	62
3	PFDoA	53
2	PFTTrA	49
1	PFTeA	57

RSD pod 9 %

Jak je vidět na obrázku 4.26, separace je poměrně pěkná, k rušení matrice nedochází. Píky spikovaného vzorku jsou sice trochu nižší a širší, než píky jednotlivých analytů ve standardní směsi (obrázek 4.25), ale plochy jsou pro většinu analytů srovnatelné.



Obrázek 4.25 – Elektroferogram standardní směsi perfluoralkylkarboxylových kyselin o koncentraci  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ , separace v nevodném pufru o složení:  $1 \text{ mol L}^{-1}$  kyselina octová s  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  octanem amonným v acetonitrilu, napětí 35 kV, proud  $0,6 \mu\text{A}$ , dávkovací čas 3 s



Obrázek 4.26 – Elektroferogram spikovaného reálného vzorku vody z Dunaje naspikovaného směsí PFCA o výsledné koncentraci  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ , separace v nevodném pufru o složení:  $1 \text{ mol L}^{-1}$  kyselina octová s  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  octanem amonným v acetonitrilu, napětí  $35 \text{ kV}$ , proud  $0,6 \mu\text{A}$ , dávkovací čas  $3 \text{ s}$

#### 4.4.5 Shrnutí CE-TOF-MS metody

CE-MS metoda je použitelná pro separaci perfluoralkylkarboxylových kyselin ( $\text{C}_5 - \text{C}_{14}$ ), její výhodou jsou velmi krátké doby analýzy řádově 2 – 4 minuty. Další výhodou této metody je přímá analýza perfluoralkylových karboxylových kyselin bez nutnosti derivatizace. Tato metoda ve spojení s prekoncentračním krokem, tedy SPE metodou, je vhodná pro měření spikovaných vzorků v jednoduchých vodných matricích, jako je například říční voda. Bohužel použitý CE-MS systém není dostatečně citlivý na stanovení ultrastopových koncentrací těchto analytů v reálných vodných vzorcích. Koncentrace PFCA se pohybují v říčních vodách v řádech jednotek až desítek  $\text{ng L}^{-1}$ . Pokud by byl v budoucnu k dispozici citlivější MS detektor ve spojení s kapilární elektroforézou, byla by tato metoda zcela použitelná pro stanovení perfluoralkylkarboxylových kyselin v reálných vzorcích životního prostředí.

#### 4.4.6 Testování optimalizované metody na CE-qqqMS/MS

Metoda CE-MS (viz kapitola 4.4.2), která byla vyvinuta a optimalizována pro přístroj CE-TOF-MS, byla aplikována na nově propojenou sestavu kapilární elektroforézy s tandemovým hmotnostním detektorem s trojitým kvadrupólem. Cílem bylo zjistit přenositelnost metody mezi jednotlivými přístroji a potvrdit či vyvrátit

předpoklad vyšší citlivosti tohoto detektoru. V případě, že by citlivost byla výrazně vyšší, bylo by možné po přeměření reálných vzorků Dunaje stanovit naše analyty – perfluoralkylové karboxylové kyseliny.

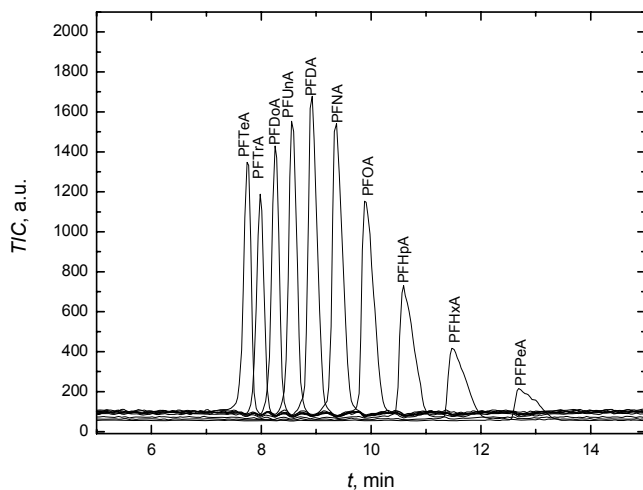
Z technických důvodů nebylo možno použít stejně krátkou a tenkou kapiláru (v případě CE-TOF-MS kapilára 28 cm a 25  $\mu\text{m}$ ), zde byla použita kapilára o délce 60 cm a vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$ . Tím bylo zřejmé, že separace bude mnohem delší, a to nejen z důvodů většího rozměru kapiláry, ale také kvůli použitému napětí, které v případě komerčního systému CE lze nastavit na maximálně 30 kV, což odpovídá pro danou délku kapiláry 500  $\text{V cm}^{-1}$  oproti 1250  $\text{V cm}^{-1}$  dosažených u CE-TOF-MS.

Nejprve bylo potřeba správně nastavit MRM přechody (multiple reaction monitoring) pro jednotlivé perfluoralkylkarboxylové kyseliny ( $\text{C}_5 - \text{C}_{14}$ ). MRM přechod zajišťuje vysokou selektivitu tím, že jsou zároveň sledovány 2 ionty charakteristické pro daný analyt. V prvním kvadrupólu se vybere tzv. mateřský ion, který se v kolizní cele fragmentuje na dceřiný ion. Vysoká citlivost je dána výrazným potlačením šumu oproti signálu dceřiného iontu, protože ve třetím kvadrupólu se již nevyskytují další rušivé fragmenty.

Každá kyselina byla testována v hmotnostním detektoru zvlášť. Pro každou kyselinu byl vybrán přechod z kvazimolekulového iontu  $[\text{M-H}]^-$  na dekarboxylovaný ion  $[\text{M-COO}]^-$ , například u PFOA šlo o přechod z mateřského iontu 413 na dceřiný ion 369. Ve spektrech jednotlivých kyselin byly tyto dva fragmenty vždy nejintenzivnější, pak bylo dále možno sledovat fragmenty vzniklé z perfluorovaného řetězce. V souladu z publikovanou literaturou (MRM přechody u používaných metod HPLC-MS/MS) byly ale brány jen MRM přechody již zmíněných kvazimolekulových iontů. Pro tyto přechody jednotlivých perfluoralkylkarboxylových kyselin byla optimalizována kolizní energie a fragmentor. Po tomto nastavení hmotnostního detektoru bylo možno přejít k samotnému testování CE-MS separace.

Separace byla prováděna se stejným pufrém, který byl použit při předchozích měřeních na CE-TOF-MS. V důsledku větších parametrů kapiláry a nižšímu napětí byly separace počátku velmi dlouhé, přes 30 min. Využitím stálého tlaku, který vhání pufr do kapiláry, bylo docíleno značného snížení migračních časů. Tento tlak byl optimalizován, ideální byl nalezen tlak 15 mbar, při kterém byla provedena separace do 14 minut, viz obrázek 4.27. První z píků nejsou zcela dostatečně rozlišené, ale

to při sledování MRM přechodů příliš nevadí, jelikož získáváme pro každou kyselinu signál zvlášť. Proto byla upřednostněna kratší analýza, při které nejsou píky příliš rozmyté.



Obrázek 4.27 – CE-qqq-MS/MS elektroferogram směsi perfluoralkylkarboxylových kyselin ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Separace v nevodném elektrolytu o složení:  $1 \text{ mol L}^{-1}$  kyselina octová s  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  octanem amonným v acetonitrilu, napětí 30 kV, proud  $2 \mu\text{A}$ , dávkování 200 mbars, stálý tlak elektrolytu do kapiláry 15 mbar

Pro výpočet LOD a LOQ byly za těchto podmínek proměřeny nižší koncentrace směsi perfluoralkylkarboxylových kyselin, a to  $10$ ,  $5$  a  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Při nejnižší koncentraci  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  ale bohužel píky byly téměř neznatelné a tudíž je nebylo možno správně vyhodnotit. Tím se ukázalo, že citlivost metody nebude lepší, než u CE-TOF-MS, u které byly detegovány některé píky kyselin i o koncentraci  $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ . LOD a LOQ metody bylo tedy počítáno z poměru S/N pro koncentraci  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ , výsledky jsou zaznamenány v tabulce 20.



Tabulka 20 – Hodnoty migračních časů (min), LOD a LOQ (ng mL<sup>-1</sup>) zaznamenané pro jednotlivé perfluoralkylkarboxylové kyseliny metodou CE-qqq-MS/MS

<i>kyselina</i>	<i>t<sub>mig</sub></i>	<i>LOD</i>	<i>LOQ</i>
PFPeA	12,7	335	1116
PFHxA	11,5	326	1085
PFHpA	10,6	286	953
PFOA	9,9	181	602
PFNA	9,4	264	880
PFDA	8,4	273	911
PFUnA	8,6	338	1127
PFDoA	8,2	468	1558
PFTTrA	7,9	400	1333
PFTTeA	7,2	503	1676

RSD pro LOD a LOQ pod 10 %

Porovnáním tabulek 17 a 20 zjistíme, že dosažené limity stanovitelnosti jsou řádově shodné pro oba přístroje, jen u kyseliny PFPeA vychází výrazně lépe LOQ u CE-TOF-MS, u ostatních kyselin jsou limity stanovitelnosti buď velmi podobné nebo nepatrně horší pro CE-qqq-MS/MS. Z toho důvodu nemělo smysl měřit reálné vzorky, protože s touto dosaženou citlivostí nelze PFCA v říčních vodách detekovat.

## 5. Závěr

1. Byla vypracována a optimalizována metoda stanovení perfluoralkylkarboxylových kyselin ( $C_5 - C_{12}$ ) pomocí plynové chromatografie po převedení na isobutylestery účinkem chlormravenčanu isobutylnatého v prostředí acetonitrilu a fosfátového pufru.
2. Byly proměřeny a srovnány retenční charakteristiky isobutylesterů perfluoralkylkarboxylových kyselin na 9 běžně dostupných kapilárních kolonách s různými stacionárními fázemi. Jako nejvíce vhodná kolona pro stanovení perfluoralkylových karboxylových kyselin byla vybrána kolona Rtx-200MS.
3. Na koloně Rtx-200MS byly studován separační mechanismus perfluoralkylkarboxylových kyselin a vypočítány fyzikálně-chemické parametry interakce analytů se stacionární fází. Tyto parametry byly porovnány s nefluorovaným homologem, a to kyselinou oktanovou.
4. Byly proměřeny kalibrační závislosti isobutylesterů perfluoralkylkarboxylových kyselin jak v prostředí acetonitrilu, tak i fosfátového pufru pomocí dvou plynových chromatografů – GC-ECD a GC-EI-MS. Z kalibračních přímků byly vypočteny a porovnány LOD a LOQ pro obě zařízení.
5. Metoda byla převedena na nový plynový chromatograf s hmotnostní detekcí a negativní chemickou ionizací, kde byly taktéž proměřeny kalibrační závislosti a vypočítány LOD ( $0,05 - 9,7 \text{ ng mL}^{-1}$ ) a LOQ ( $0,16 - 32,2 \text{ ng mL}^{-1}$ ). Z těchto údajů bylo jednoznačně dokázáno, že tento přístroj je velmi citlivý pro detekci perfluorovaných látek.
6. Byla vyvinuta a optimalizována prekoncentrační metoda extrakce na tuhé fázi s použitím kolonek Supel-Select HLB. Bylo dosaženo prekoncentračního faktoru 400 a určeno recovery pro spikované reálné vzorky pro jednotlivé perfluoralkylkarboxylové kyseliny mezi 53 – 100 %

7. Bylo provedeno stanovení perfluoralkylových karboxylových kyselin v reálných vzorcích říční vody Vltavy a Labe. Ve všech analyzovaných vzorcích byla detekována kyselina perfluoroktanová (PFOA) v koncentračním rozpětí rozpětí 4 (LOD) – 28  $\text{pg mL}^{-1}$  a PFNA kyselina perfluornonanová v rozpětí 0,1 (LOQ) – 4  $\text{pg mL}^{-1}$ .

8. Byla testována separace pomocí HPLC-ESI(-)-MS.

9. Byla vyvinuta a optimalizována metoda stanovení perfluoralkylkarboxylových kyselin pomocí kapilární zónové elektroforézy ve spojení s TOF hmotnostním spektrometrem. Tato metoda byla ve spojení s použitou SPE prekoncentrační metodou testována na reálných vzorcích říční vody Dunaje. Tato metoda však nebyla dostatečně citlivá, koncentrace analytů se nacházela pod limitem detekce této metody. Metoda byla ještě testována na přístroji CE-MS/MS s trojitým quadrupólem, avšak ani tam nebylo dosaženo dostatečné citlivosti pro měření ultrastopových koncentrací perfluoralkylových karboxylových kyselin, které se nacházejí v říčních vzorcích.

10. Jednotlivé separační metody byly mezi sebou porovnány. Výhodou metody GC-NCI-MS je její vysoká citlivost, výhodou metody CE-TOF-MS zase velmi rychlé analýzy.

## 6. Seznam zkratk

$A$ – plocha píku	s tandemovou hmotnostní detekcí
a.u. – arbitrární jednotka signálu	HPLC-ESI-MS/MS – vysokoúčinná
AFFF – speciální protipožární pěna	kapalinová chromatografie
$a_i$ – fyzikální vlastnosti analytu	s tandemovou hmotnostní detekcí a
APFO – amonná sůl perfluoroktanové	elektrosprejovou ionizací
kyseliny	IBCF – chlormravenčan isobutylnatý
APFN – amonná sůl perfluornonanové	IPE – iontově-párová extrakce
kyseliny	$j_{mn}$ – kompresibilitní korigovaný faktor
$c$ – molární koncentrace	$K$ – parametr konstrukční vlastnosti
CE-qqq-MS/MS – kapilární	měřícího zařízení
elektroforéza s tandemovou hmotnostní	$k$ – retenční faktor
detekcí a trojitým kvadrupólem	$K_D$ – distribuční konstanta rozpuštěné
CMC – kritická micelární koncentrace	látky mezi stacionární a mobilní fází
$d_f$ – tloušťka filmu zakotvené	$K_{ow}$ – rozdělovací koeficient mezi
stacionární fází	oktanolem a vodou
EPA – agentura ochrany životního	$L$ – délka kolony
prostředí USA	$l$ – koeficient linearity
$F$ – průtoková rychlost nosného plynu	$l_d$ – délka kolony k detektoru
$f_{im}$ – fugacita rozpuštěné látky v	$l_c$ – celková délka kolony
mobilní fázi	$l_i$ – konstanta vztažená k nekonečnému
$f_{is}$ – fugacita rozpuštěné látky ve	zředění vzorku
stacionární fázi	LC-MS/MS – kapalinová
$f_{im}^0$ – fugacita rozpuštěné látky ve	chromatografie s tandemovou
standardním stavu v mobilní fázi	hmotnostní detekcí
$f_{is}^0$ – fugacita rozpuštěné látky ve	LD <sub>50</sub> – střední letální dávka
standardním stavu ve stacionární fázi	LLE – extrakce kapaliny kapalinou
FTCA – fluortelomerní karboxylová	LOD – limit detekce
kyselina	LOQ – limit stanovitelnosti
FTOH – fluortelomerní alkohol	$M_s$ – relativní molekulová hmotnost
GC – plynová chromatografie	stacionární fáze
GC-ECD – plynová chromatografie	M 570 – <i>N</i> -
s detektorem elektronového záchytu	methylerfluoroktansulfonamidacetát
GC-EI-MS – plynová chromatografie	MRM – multiple reaction monitoring
s hmotnostní detekcí a elektronovou	$m/z$ – poměr hmotnosti a náboje
ionizací	$n$ – počet teoretických pater
GC-MS – plynová chromatografie	$n_{eff}$ – počet efektivních teoretických
s hmotnostní detekcí	pater
GC-NCI-MS – plynová chromatografie	<i>N</i> -EtFOSE – <i>N</i> -
s hmotnostní detekcí a negativní	etylperfluoroktansulfonamidetanol
chemickou ionizací	NIST – knihovna spekter
$h_i$ – Henryho konstanta rozpuštěné	OECD – Organizace pro hospodářskou
látky	spolupráci a rozvoj
HPLC-MS – vysokoúčinná kapalinová	$p^0$ – standardní tlak 101325 Pa
chromatografie s hmotnostní detekcí	$p_i$ – vstupní tlak do kolony
HPLC-MS/MS – vysokoúčinná	$p_o$ – výstupní tlak z kolony
kapalinová chromatografie	PFBA – perfluorbutanová kyselina

PFBuS – perfluorbutansulfonát	$T_c$ – teplota kolony
PFC – perfluorovaná sloučenina	TIC – celkový iontový proud
PFCA – perfluorkarboxylová kyselina	$t_{eof}$ – migrační čas markeru elektroosmotického toku
PFDA – perfluordekanová kyselina	$t_M$ – mrtvý čas mobilní fáze
PFDoA – perfluordodekanová kyselina	$t_R$ – retenční čas
PFDS – perfluordekansulfonát	$t_R'$ – redukovaný retenční čas
PFHpA – perfluorheptanová kyselina	$U$ – vložené napětí
PFHxA – perfluorhexanová kyselina	UPLC-MS/MS – ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí
PFHxA-Bu – butylester kyseliny perfluorhexanové	$V$ – objem
PFHxS – perfluorhexansulfonát	$V_g$ – specifický retenční objem
$pK_a$ – záporný dekadický logaritmus disociační konstanty kyseliny	$w$ – hmotnost stacionární fáze
PFN – perfluornonanoát	$x_{im}$ – koncentrace rozpuštěné látky v mobilní fázi
PFNA – perfluornonanová kyselina	$x_{im}^0$ – standardní koncentrace rozpuštěné látky v mobilní fázi
PFO – perfluoroktanoát	$x_{is}$ – koncentrace molární frakce ve stacionární fázi
PFOA – perfluoroktanová kyselina	$x_{is}^0$ – standardní koncentrace molární frakce ve stacionární fázi
PFOS – perfluorotansulfonát	$z_m$ – kompresibilitní faktor mobilní fáze
PFOSA – perfluoroktansulfonamid	$\beta$ – fázový poměr
PFOSF – perfluoroktansulfonylfluorid	$\gamma_{is}$ – aktivitní koeficient rozpuštěné látky v stacionární fázi
PFPeA – perfluorpentanová kyselina	$\gamma_{is}^m$ – molální aktivitní koeficient rozpuštěné látky v stacionární fázi
PFPeA-Me – metylester kyseliny perfluorpentanové	$\mu_{eff}$ – Efektivní elektroforetická pohyblivost
PFTeA – perfluortetradekanová kyselina	$\mu_{im}^0$ – standardní chemický potenciál rozpuštěné látky v mobilní fázi
PFTTrA – perfluortridekanová kyselina	$\mu_{is}^0$ – standardní chemický potenciál rozpuštěné látky ve stacionární fázi
PFUnA – perfluorundekanová kyselina	$\rho_{sp}$ – hustota stacionární fáze
POPs – perzistentní organické polutanty	$v_{im}$ – fugacitní koeficient rozpuštěné látky ve směsi s nosným plynem při teplotě $T_c$ a tlaku $p$
PTFE – polytetrafluorethylen	6:2 FtS – 1H, 1H, 2H, 2H-perfluoroktansulfonát
PVDF – polyvinylidenfluorid	$^{19}\text{F}$ NMR – nukleární magnetická rezonance izotopu $^{19}\text{F}$
$R$ – univerzální plynová konstanta	$\Delta H$ – parciální molární entalpie
$S$ – signál	$\Delta G$ – parciální molární Gibbsova energie rozpouštění
SAX – silná anion-výměnná stacionární fáze v SPE	$\Delta S$ – parciální molární entropie
SCX – silná kation-výměnná stacionární fáze v SPE	
$SD$ – směrodatná odchylka	
$SDR$ – společná směrodatná odchylka regrese	
SIM – proud iontu o zvolené hodnotě $m/z$	
SLE – extrakce tuhá látka – kapalina	
$S/N$ – poměr signálu k šumu	
SPE – extrakce na tuhé fázi	
SPME – mikroextrakce na tuhé fázi	
$t$ – čas	
$T$ – teplota	

## 7. Použitá literatura

- [1] de Voogt P.; Sáez M.: Analytical chemistry of perfluoralkylated substance. *Trends in Analytical Chemistry* **25**, 326-342 (2006)
- [2] Yamashita N.; Kannan K.; Taniyasu S.; Horii Y.; Okazawa T.; Petrick G.; Gamo T.: Analysis of perfluorinated acids at parts-per-quadrillion levels in seawater using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Environ. Sci. Technol.* **38**, 5522-5527 (2004).
- [3] Tseng C.L.; Liu L.L.; Chen C.M.; Ding W.H.: Analysis of perfluorooctansulfonate and related fluorochemicals in water and biological tissue samples by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* **1105**, 119-126 (2006)
- [4] Liou J.S.-C.; Szostek B.; DeRito C.M.; Madsen E.L.: Investigating the biodegradability of perfluorooctanoic acid, *Chemosphere* **80**, 176-183 (2010)
- [5] Moody C.A.; Field J.A.: Perfluorinated Surfactants and the Environmental Implications of Their Use in Fire-Fighting Foams, *Environ. Sci. Technol.* **34**, 3864-3870 (2000)
- [6] Schröder H.F.: Determination of fluorinated surfactants and their metabolites in sewage sludge samples by liquid chromatography with mass spectrometry after pressurised liquid extraction and separation on fluorine-modified reversed-phase sorbents, *J. Chromatogr. A* **1020**, 131-151 (2003)
- [7] Schultz M.M.; Higgins C.P.; Huset C.A.; Luthy R.G.; Barofsky D.F.; Field J. A.: Fluorochemical Mass Flows in a Municipal Wastewater Treatment Facility, *Environ. Sci. Technol.* **40**, 7350-7357 (2006)
- [8] Goss K.U.; Bronner G.; Harner T.; Hertel M.; Schmidt T.C.: The Partition Behavior of Fluorotelomer Alcohols and Olefins, *Environ. Sci. Technol.* **40**, 3572-3577 (2006)
- [9] Goss K.U.: The pK<sub>a</sub> Values of PFOA and Other Highly Fluorinated Carboxylic Acids, *Environ. Sci. Technol.* **42**, 456-458 (2008)
- [10] Higgins C.; Luthy R.: Sorption of Perfluorinated Surfactants on Sediments, *Environ. Sci. Technol.* **40**, 7251-7256 (2006)
- [11] Houde M.; Martin J.W.; Letcher R.J.; Salomon K.R.; Muir D.C.G.: Biological Monitoring of Polyfluoroalkyl Substance: A Review, *Environ. Sci. Technol.* **40**, 3463-3473 (2006)
- [12] Sigma-Aldrich: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/DisplayMSDSContent.do>
- [13] Prevedouros K.; Cousins I.T.; Buck R.C.; Korzeniowski S.H.: Sources, Fate and Transport of Perfluorocarboxylates, *Environ. Sci. Technol.* **40**, 32-44 (2006)
- [14] Alzaga R.; Bayona J. M.: Determination of perfluorocarboxylic acids in aqueous matrices by ion-pair solid-phase microextraction-in-port derivatization-gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* **1042**, 155-162 (2004)
- [15] Alzaga R.; Salgado-Pentinal C.; Jover E.; Bayona J. M.: Development of procedure for the determination of perfluorocarboxylic acids in sediments by pressurised fluid extraction, headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatographic-mass spectrometric determination, *J. Chromatogr. A* **1083**, 1-6 (2005)
- [16] Burns D.C.; Ellis D.A.; Li H.; McMurdo C.J.; Webster E.: Experimental pK<sub>a</sub> Determination for Perfluorooctanoic Acid (PFOA) and the Potential Impact of pK<sub>a</sub> Concentration Dependence

- on Laboratory- Measured Partitioning Phenomena and Environmental Modeling: *Environ. Sci. Technol.* **42**, 9283-9288 (2008).
- [17] Nordstierna L.; Furó I.; Stilbs P.; Mixed Adsorption of Fluorinated and Hydrogenated Surfactants, *Langmuir* **22**, 7969-7974 (2006)
- [18] Sinclair E.; Mayack D.T.; Roblee K.; Yamashita N.; Kannan K.: Occurrence of Perfluoroalkyl Surfactants in Water, Fish, and Birds from New York State, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **50**, 398-410 (2006)
- [19] Jahnke A.; Ahrens L.; Ebinghaus R.; Berger U.; Barber J. L.; Temme C.: An improved method for the analysis of volatile polyfluorinated alkyl substances in environmental air samples, *Anal. Bioanal. Chem.* **387**, 965-975 (2007)
- [20] Hekster F.M.; de Voogt P.: Perfluoralkylated substance – Aquatic environmental assessment. *RIKZ and University of Amsterdam. Report RIKZ 2002/0.43* (2002)
- [21] Taniyasu S.; Kannan K.; So M. K.; Gulkowska A.; Sinclair E.; Okazawa T.; Yamashita N.: Analysis of fluorotelomer alcohols, fluorotelomer acids, and short- and long-chain perfluorinated acids in water and biota, *J. Chromatogr. A* **1093**, 89-97 (2005)
- [22] Dinglasan M.J.A.; Ye Y.; Edwards E.A.; Mabury S.A.: Fluorotelomer Alcohol Biodegradation Yields Poly- and Perfluorinated Acids, *Environ. Sci. Technol.* **38**, 2857-2864 (2004)
- [23] Martin J.W.; Muir D.C.G.; Moody C.A.; Ellis D.A.; Kwan W.C.; Solomon K.R.; Mabury S.A.: Collection of Airborne Fluorinated Organics and Analysis by Gas Chromatography/Chemical Ionization Mass Spectrometry *Anal. Chem.* **74**, 584-590 (2002)
- [24] Mawn M.P.; McKay R.G.; Ryan T.W.; Szostek B.; Powley C.R.; Buck R.C.: Determination of extractable perfluorooctanoic acid (PFOA) in water, sweat simulant, saliva simulant, and methanol from textile and carpet samples by LC/MS/MS, *Analyst* **130**, 670-678 (2005)
- [25] Loos R.; Locoro G.; Huber T.; Wollgast J.; Christoph E.H.; de Jager A.; Gawlik B.M.; Hanke G.; Umlauf G.; Zaldivar J.-M.: Analysis of perfluorooctanoate (PFOA) and other perfluorinated compounds (PFCs) in the River Po watershed in N-Italy, *Chemosphere* **71**, 306-313 (2008)
- [26] Saito K.; Uemura E.; Ishizaki A.; Katanka H.: Determination of perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta* **658**, 141-146 (2010)
- [27] Kovářová J.; Svobodová Z.: Perfluorinated compounds: occurrence and risk – A review, *Neurotoxicol. Letters* **29**, 599-608 (2008)
- [28] Davis K.L.; Aucoin M.D.; Larsen B.S.; Kaiser M.A.; Hartten A.S.: Transport of ammonium perfluorooctanoate in environmental media near a fluoropolymer manufacturing facility, *Chemosphere* **67**, 2011-2019 (2007)
- [29] Powley C.R.; Michalczyk M.J.; Kaiser M.A.; Buxton L.W.: Determination of perfluorooctanoic acid (PFOA) extractable from the surface of commercial cookware under simulated cooking conditions by LC/MS/MS, *Analyst* **130**, 1299-1302 (2005)

- [30] González-Barreiro C.; Martínez-Carballo E.; Sitka A.; Scharf S.; Gans O.: Method optimization for determination of selected perfluorinated alkylated substances in water samples, *Anal. Bioanal. Chem.* **386**, 2123-2132 (2006)
- [31] Villagrasa M.; López de Alda M.; Barceló D.: Environmental analysis of fluorinated alkyl substances by liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry: a review, *Anal. Bioanal. Chem.* **386**, 953-972 (2006)
- [32] Hashikawa Y.; Kawasaki M.; Waterland R.L.; Hurley M.D.; Ball J.C.; Wallington T.J.; Sulbaek Anderson M.P.; Nielsen O.J.: Gas phase UV and IR absorption spectra of  $C_xF_{2x+1}CHO$  ( $x = 1-4$ ), *Journal of Fluorine Chemistry* **125**, 1925-1932 (2004)
- [33] Kaiser M.A.; Larsen B.S.; Kao C.C.; Buck R.C.: Vapor Pressures of Perfluorooctanoic, -nonanoic, -decanoic, -undecanoic, and -dodecanoic Acids, *J. Chem. Eng. Data* **50**, 1841-1843 (2005)
- [34] Flaherty J. M.; Connolly P. D.; Decker E. R.; Kennedy S. M.; Ellefson M. E.; Reagen W. K.; Szostek B.  
Quantitative determination of PFOA in serum and plasma by LC-MS-MS, *J. Chromatogr. B* **819**, 329-338 (2005)
- [35] [www.green-pan.com](http://www.green-pan.com)
- [36] Gosetti F.; Chiuminatto U.; Zampieri D.; Mazzucco E.; Robotti E.; Calabrese G.; Gennaro M.C.; Marengo E.: Determination of perfluorochemicals in biological, environmental and food samples by an automated on-line solid phase extraction ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* **1217** 7864-7872 (2010)
- [37] Weremiuk A. M.; Gerstmann S.; Frank H.: Quantitative determination of perfluorinated surfactants in water by LC-ESI-MS/MS, *J. Sep. Sci.* **29**, 2251-2255 (2006)
- [38] Kannan K.; Choi J. W.; Iseki N.; Senthikumar K.; Kim D. H.; Masunaga S.; Giesy J. P.: Concentrations of perfluorinated acids in livers of birds from Japan and Korea, *Chemosphere* **49**, 225-231 (2002)
- [39] Ohya T.; Kudo N.; Suzuki E.; Kawashima Y.: Determination of perfluorinated carboxylic acids in biological samples by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B* **720**, 1-7 (1998)
- [40] Moody C.A.; Martin J.W.; Kwan W.C.; Muir D.C.G.; Mabury S.A.: Monitoring Perfluorinated Surfactants in Biota and Surface Water Samples Following an Accidental Release of Fire-Fighting Foam into Etobicoke Creek, *Environ. Sci. Technol.* **36**, 545-551 (2002)
- [41] Schultz M.M.; Barofsky D.F.; Field J.A.: Quantitative Determination of Fluorotelomer Sulfonates in Groundwater by LC-MS/MS, *Environ. Sci. Technol.* **38**, 1828-1835 (2004)
- [42] Prevederous K.; Krusic P.C.; Roe D.C.: Gas-Phase NMR Technique for Studying the Thermolysis of Materials: Thermal Decomposition of Ammonium Perfluorooctanoate, *Anal. Chem.* **76**, 3800-3803 (2004)
- [43] Ahrens .; Xie Z.; Ebinghaus R.: Distribution of perfluoroalkyl compounds in seawater from Northern Europe, Atlantic Ocean and Southern Ocean, *Chemosphere* **78**, 1011-1016 (2010)



- [44] Moody C.A.; Kwan W.C.; Martin J.W.; Muir D.C.G.; Mabury S.A.: Determination of Perfluorinated Surfactants in Surface Water Samples by Two Independent Analytical Techniques: Liquid chromatography/ tandem mass spectrometry and  $^{19}\text{F}$  NMR, *Anal. Chem.* **73**, 2200-2206 (2001)
- [45] So M.K.; Taniyasu S.; Lam P.K.S.; Zheng G.J.; Giesy J.P.; Yamashita N.: Alkaline Digestion and Solid Phase Extraction Method for Perfluorinated Compounds in Mussels and Oysters from South China and Japan, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **50**, 240-248 (2006)
- [46] Li, M.-H.: Toxicity of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid to plants and aquatic invertebrates, *Environ. Toxicol.* **24**, 95-101 (2009)
- [47] Agentura ochrany prostředí USA (EPA) "Perfluorooctanoic Acid (PFOA) and Fluorinated Telomers: 2010/2015 PFOA Stewardship program." <http://www.epa.gov/oppt/pfoa/index.html> (2006)
- [48] OECD 2002 Hazard assessment of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and its salts, Environment Directorate, Organization for Economic Co-operation and Development, ENV/JM/RD17/FINAL. JT00135607 (2009)
- [49] Suja F.; Pramanik B.K.; Zain S.M.: Contamination, bioaccumulation and toxic effects of perfluorinated chemicals (PFCs) in the water environment: a review paper, *Water Science and Technology* **60.6** 1533-1544 (2009)
- [50] Kärman A.; Van Bavel B.; Järnberg U.; Hardell L.; Lindström G.: Development of Solid-Phase Extraction – HPLC/Single Quadrupole MS Method for Quantification of Perfluorochemicals in Whole Blood, *Anal. Chem.* **77**, 864-870 (2005)
- [51] Harada K.; Xu F.; Ono K.; Iijima T.; Koizumi A.: Effects of PFOS and PFOA on L-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents in guinea-pig ventricular myocytes, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **329**, 487-494 (2005)
- [52] Hanson M. L.; Small J.; Sibley P. K.; Boudreau T. M.; Brain R. A.; Mabury S. A.; Salomon K. R.: Microcosm Evaluation of the Fate, Toxicity, and Risk to Aquatic Macrophytes from Perfluorooctanoic Acid (PFOA), *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **49**, 307-316 (2005)
- [53] Butenhoff J. L.; Kennedy, G. L.; Hinderliter P. M.; Lieder P. H.; Jung R.; Hansen K. J.; Gorman G. S.; Noker P. E.; Thomford P. J.: Pharmacokinetics of Perfluorooctanoate in Cynomolgus Monkeys, *Toxicological Sciences* **82**, 394-406 (2004)
- [54] Tichý M.; Valigurová R.; Čabala R.; Uzlová R.; Rucki M.: Toxicity of perfluorinated carboxylic acids for aquatic organisms, *Interdisc Toxicol.* **3(2)**, 73–75 (2004)
- [55] Inoue K.; Okada F.; Ito R.; Kawaguchi M.; Okanouchi N.; Nakazawa H.: Determination of perfluorooctane sulfonate, perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonylamide in human plasma by column-switching liquid chromatography-electrospray mass spectrometry coupled with solid-phase extraction, *J. Chromatogr. B* **810**, 49-56 (2004)
- [56] Van den Heuvel J.P.; Kuslikis B.I.; Peterson R.E.: Covalent binding of perfluorinated fatty acids to proteins in the plasma, liver and testes of rats, *Chem.-Biol. Interact.* **82**, 317-328 (1992)
- [57] Agentura ochrany prostředí USA (EPA) "Draft Risk Assessment of the Potential Human Health Effects Associated With Exposure to Perfluorooctanoic Acid and Its Salts (PFOA): <http://www.epa.gov/oppt/pfoa/pubs/pfoarisk.pdf> (2005)

- [58] Burris J.M.; Lungberg J.K.; Olsen G.; Simpson C.; Mandel J.: Interim report No.2, Determination of serum half-lives of several fluorochemicals. St. Paul (MN), 3M Company, U.S. EPA Public Docket AR-226 (2002)
- [59] Kudo N.; Suzuki E.; Katakura M.; Ohmori K.; Noshiro R.; Kawashima Z.: Comparison of the elimination between perfluorinated fatty acids with different carbon chain length in rats, *Chem.-Biol. Interact.* **134**, 203-216 (2001)
- [60] Agentura ochrany zdraví Velké Británie (2008):  
<http://www.hpa.org.uk/Topics/ChemicalsAndPoisons/CompendiumOfChemicalHazards/PFOSOrPFOA/>
- [61] Moody C.A.; Kwan W.C.; Martin J.W.; Muir D.C.G.; Mabury S.A.: Determination of Perfluorinated Surfactants in Surface Water Samples by Two Independent Analytical Techniques: Liquid chromatography/ tandem mass spectrometry and  $^{19}\text{F}$  NMR, *Anal. Chem.* **73**, 2200-2206 (2001)
- [62] Miyake Y.; Yamashita N.; Soa M.K.; Rostkowski P.; Taniyasu S.; Lamb P.K.S.; Kannan K.: Trace analysis of total fluorine in human blood using combustion ion chromatography for fluorine: A mass balance approach for the determination of known and unknown organofluorine compounds, *J. Chromatogr. A* **1154**, 214–221 (2007)
- [63] Kissa E.: Determination of organofluorine in air, *Environ. Sci. Technol.* **20**, 1254-1257 (1986)
- [64] Belisle J.; Hagen D.F.: A method for the determination of perfluorooctanoic acid in blood and other biological samples, *Analytical Biochemistry* **101**, 369-376 (1980)
- [65] Henderson W.M.; Weber E.J.; Duirk S.E.; Washington J.W.; Smith M.A.: Quantification of fluorotelomer-based chemicals in mammalian matrices by monitoring perfluoroalkyl chain fragments with GC/MS, *J. Chromatogr. B* **846** (2007) 155-161
- [66] Moody C.A.; Field J.A.: Determination of Perfluorocarboxylates in Groundwater Impacted by Fire-Fighting Activity, *Environ. Sci. Technol.* **33**, 2800-2806 (1999)
- [67] Scott B.F.; Moody C.A.; Spencer C.; Small J.M.; Muir D.C.G.; Mabury S.A.: Analysis for Perfluorocarboxylic Acids/Anions in Surface Waters and Precipitation Using GC-MS and Analysis of PFOA from Large-Volume Samples, *Environ. Sci. Technol.* **40**, 6405-6410 (2006)
- [68] Scott B.F.; Spencer C.; Mabury S.A.; Muir D.C.G.: Poly and Perfluorinated Carboxylates in North American Precipitation, *Environ. Sci. Technol.* **40**, 7167-7174 (2006)
- [69] Orata F.; Quinete N.; Wilken R.-D.: Long Chain Perfluorinated Alkyl Acids Derivatisation and Identification in Biota and Abiota Matrices Using Gas Chromatography, *Bull Environ Contam Toxicol* **83**, 630-635 (2009)
- [70] Dufková V.: Stanovení perfluorovaných polutantů metodou GC a GC-MS, Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie (2007)
- [71] Hušek P.: Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents, *J. Chromatogr. B* **717**, 57-91 (1998)
- [72] Hušek P.; Šimek P.; Matucha P.: Smooth Esterification of Di- and Tricarboxylic Acids with Methyl and Ethyl Chloroformates in Gas Chromatographic Profiling of Urinary Acidic Metabolites *Chromatographia* **58**, 623-630 (2003)

- [73] Husek P.; Simek P.: Alkyl chloroformates in sample derivatization strategies for GC analysis. Review on a decade use of the reagents as esterifying agents, *Curr. Pharm. Anal.* **2** 23-43 (2006)
- [74] Husek P.; Simek P.; Tvrzicka E.: Simple and rapid procedure for the determination of individual free fatty acids in serum, *Anal. Chim. Acta* **465** 433-439 (2002)
- [75] Husek P.: Fast derivatization and GC analysis of phenolic acids, *Chromatographia* **34** 621-626 (1992)
- [76] Dufková V.; Čabala R.; Maradová D.; Štícha M.: A fast derivatization procedure for gas chromatographic analysis of perfluorinated organic acids, *J. Chromatogr. A* **1216**, 8659-8664 (2009)
- [77] Loganathan B.G.; Sajwan K.S.; Sinclair E.; Kumar K.S.; Kajman K.: *Water Research* **41** 4611-4616 (2007)
- [78] Washington J.W.; Henderson W.M.; Ellington J.J.; Jenkins T.M.; Evans J.J.: Analysis of perfluorinated carboxylic acids in soils II: Optimization of chromatography and extraction *J. Chromatogr. A* **1181** 21-32 (2008)
- [79] Furdui V.I.; Helm P.A.; Crozier P.W.; Lucaciu C.; Reiner E.J.; Marvin C.H.; Whittle D.M.; Mabury S.A.; Tomy G.T.: *Environ. Sci. Technol.* **42**, 4739-4744 (2008)
- [80] Becker A.M.; Gerstmann S.; Frank H.: Perfluorooctane surfactants in waste waters, the major source of river pollution, *Chemosphere* **72**, 115-121 (2008)
- [81] So M.K.; Miyake Y.; Yeung W.Y.; Ho Y.M.; Taniyasu S.; Rostkowski P.; Yamashita N.; Zhou B.S.; Shi X.J.; Wang J.X.; Giesy J.P.; Yu H.; Lam P.K.S.: Perfluorinated compounds in the Pearl River and Yangtze River of China, *Chemosphere* **68**, 2085-2095 (2007)
- [82] McLachlan M.; Holmström K.E.; Reth M.; Berger U.: Riverine Discharge of Perfluorinated Carboxylates from the European Continent, *Environ. Sci. Technol.* **41**, 7260-7265 (2007)
- [83] Loos R.; Locoro G.; Contini S.: Occurrence of polar organic contaminants in the dissolved water phase of the Danube River and its major tributaries using SPE-LC-MS<sup>2</sup> analysis, *Water Research* **44**, 2325-2335 (2010)
- [84] Loos R.; Locoro G.; Comero S.; Contini S.; Schwesig D.; Werres F.; Balsa P.; Gans O.; Weiss S.; Blaha L.; Bolchi M.; Gawlik B.M.: Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water, *Water Research* **44**, 4115-4126 (2010)
- [85] Ahrens L.; Plassmann M.; Xie Z.; Ebinghaus R.: Determination of polyfluoroalkyl compounds in water and suspended particulate matter in the river Elbe and North Sea, Germany, *Front. Environ. Sci. Engin. China* **3**(2), 152-170 (2009)
- [86] Clara M.; Gans O.; Weiss S.; Sanz-Escribano D.; Scharf S.; Scheffknecht C.: Perfluorinated alkylated substances in the aquatic environment: An Austrian case study, *Water Research* **43**, 4760-4768 (2009)
- [87] Möller A.; Ahrens L.; Surm R.; Westerveld J.; van der Wielen F.; Ebinghaus R.; de Voogt P.: Distribution and sources of polyfluoroalkyl substances (PFAS) in the River Rhine watershed, *Environmental Pollution* **158**, 3243-3250 (2010)

- [88] Nakayama S.F.; Strynar M.J.; Reiner J.L.; Delinsky A.D.; Lindström A.B.: Determination of Perfluorinated Compounds in the Upper Mississippi River Basin, *Environ. Sci. Technol.* **44**, 4103-4109 (2010)
- [89] Furdui V.I.; Crozier P.W.; Reiner E.J.; Mabury S.A.: Trace level determination of perfluorinated compounds in water by direct injection, *Chemosphere* **73**, S24-S30 (2008)
- [90] Quinete N.; Wub Q.; Zhang T.; Yun S.H.; Moreira I.; Kannan K.: Specific profiles of perfluorinated compounds in surface and drinking waters and accumulation in mussels, fish, and dolphins from southeastern Brazil, *Chemosphere* **77**, 863–869 (2009)
- [91] Jin Y.H.; Liu W.; Sato I.; Nakayama S.F.; Sasaki K.; Saito N.; Tsuda S.: PFOS and PFOA in environmental and tap water in China, *Chemosphere* **77**, 605-611 (2009)
- [92] Kunacheva C.; Boontanon S.K.; Fujii S.; Tanaka S.; Musirat C.; Artsalee C.; Wongwattana T.: Contamination of perfluorinated compounds (PFCs) in Chao Phraya River and Bangpakong River, Thailand. *Water Science & Technology* **60**, 975 – 982 (2009)
- [93] Yeung L.W.Y.; Yamashita N.; Taniyasu S.; Lam P.K.S.; Sinha R.K.; Borole D.V.; Kannan K.: A survey of perfluorinated compounds in surface water and biota including dolphins from the Ganges River and in other waterbodies in India, *Chemosphere* **76**, 55–62 (2009)
- [94] Schultz M.M.; Barofsky D.F.; Field J.A.: Quantitative Determination of Fluorinated Alkyl Substances by Large-Volume-Injection Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry - Characterization of Municipal Wastewaters, *Environ. Sci. Technol.* **40:1**, 289-295 (2006)
- [95] Kannan K.; Corsolini S.; Falandysz J.; Fillmann G.; Kumar K.S.; Loganathan B.G.; Mohd M.A.; Olivero J.; Van Wouwe N.; Yang J.H.; Aldous K.M.: Perfluorooctanesulfonate and Related Fluorochemicals in Human Blood from Several Countries, *Environ. Sci. Technol.* **38**, 4489-4495 (2004)
- [96] Midasch O.; Drexler H.; Hart N.; Beckmann M.W.; Angerer J.: Transplacental exposure of neonates to perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate: a pilot study, *Int Arch Occup Environ Health* **80**, 643-648 (2007)
- [97] Kärman A.; Ericson I.; van Bavel B.; Darnerud P.O.; Aune M.; Glynn A.; Lignell S.; Lindström G.: Exposure of perfluorinated chemicals through lactation: levels of matched human milk and serum and a temporal trend, 1996–2004, in Sweden, *Environ. Health Perspect.* **115**, 226-230 (2007)
- [98] Giesy J.P.; Kannan K.: Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife, *Environ. Sci. Technol.* **35**, 1339-1342 (2001)
- [99] Martin J.W.; Smithwick M.M.; Braune B.M.; Hoekstra P.F.; Muir D.C.G.; Mabury S.A.: Identification of long-chain perfluorinated acids in biota from the Canadian Arctic, *Environ. Sci. Technol.* **38**, 373-380 (2004)
- [100] Loos R.; Wollgast J.; Huber T.; Hanke G.: Polar herbicides, pharmaceutical products, perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and nonylphenol and its carboxylates and ethoxylates in surface and tap waters around Lake Maggiore in northern Italy, *Anal. Bioanal. Chem.* **387**, 1469-1478 (2007)
- [101] Hölzer J.; Midasch O.; Rauchfuss K.; Kraft M.; Reupert R.; Angerer J.; Kleeschulte P.; Marschall N.; Wilhelm M.: Biomonitoring of Perfluorinated Compounds in Children and Adults Exposed

- to Perfluorooctanoate-Contaminated Drinking Water, *Environmental Health Perspectives* **116** 651-657 (2008)
- [102] Takagi S.; Adachi F.; Miyano K.; Koizumi Y.; Tanaka H.; Mimura M.; Watanabe I.; Tanabe S.; Kannan K.: Perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate in raw and treated tap water from Osaka, Japan, *Chemosphere* **72**, 1409-1412 (2008)
- [103] Wójcik L.; Korczak K.; Szostek B.; Trojanowicz M.: Separation and determination of perfluorinated carboxylic acids using capillary zone electrophoresis with indirect photometric detection, *J. Chromatogr. A* **1128**, 290-297 (2006)
- [104] Wójcik L.; Szostek B.; Maruszak W.; Trojanowicz M.: Separation of perfluorocarboxylic acids using capillary electrophoresis with UV detection, *Electrophoresis* **26**, 1080-1088 (2005)
- [105] Masár M.; Wójcik L.; Kaniánský D.; Trojanowicz M.: Zone electrophoresis separation of perfluorocarboxylic acids on a chip with conductivity detection, *J. Sep. Sci.* **28**, 1271-1277 (2005)
- [106] Higgins C. P.; Field J. A.; Criddle C. S.; Luthy R. G. Quantitative Determination of Perfluorochemicals in Sediments and Domestic Sludge, *Environ. Sci. Technol.* **39**, 3946-3956 (2005)
- [107] Hansen K.J.; Clemen L.A.; Ellefson M.E.; Johnson H.O.: Compound-Specific, Quantitative Characterization of Organic Fluorochemicals in Biological Matrixes, *Environ. Sci. Technol.* **35**, 766-770 (2001)
- [108] Conder J.R.; Young C.L.: *Physicochemical Measurement by Gas Chromatography*, Wiley, New York (1979)
- [109] Purnell H.: *Gas Chromatography*, Wiley, New York (1962)
- [110] Giddings J.C.: *Dynamics of Chromatography*, M. Dekker, New York (1965)
- [111] Denbigh K.: *The principles of Chemical Equilibrium*, Cambridge University Press, Cambridge (1957)
- [112] Novák J.: Thermodynamická interpretace chromatografických retenčních dat – Distribuční konstanta a standardní sorbční Gibbsova energie, *Chemické listy*, **72** (1978) 1043-1057
- [113] Littlewood A.B.: *Gas Chromatography*, Academic Press, New York, London (1962)
- [114] Štulík K. a kol.: *Analytické separační metody*, Praha, Nakladatelství Karolinum (2004)
- [115] Macherey-Nagel, *Solid Phase Extraction application guide*
- [116] Supelco – Guide to solid phase extraction, Bulletin 910
- [117] Smolková E.; Feltl L.: *Analýza látek v plynném stavu*, Praha, SNTL (1991)
- [118] Opekar F.; Jelínek I.; Rychlovský P.; Plzák Z.: *Základní analytická chemie*, Praha, Nakladatelství Karolinum (2003)
- [119] McReynolds W.O.: *J. Chromatogr. Sci.* **8** 685-694 (1970)
- [120] Pacáková V.; Feltl L.: *Chromatographic retention indices*, Ellis Horwood Ltd., Chichester (1992)
- [121] Scott R.P.W.: *Principles and Practice of Chromatography*, Library for Science, LLC, (2003) <http://www.library4science.com/>
- [122] Abraham M.H.; Poole C.F.; Poole S.K.: Classification of stationary phases and other materials by gas chromatography, *J. Chromatogr. A* **842** 79-114 (1999)

## 8. Přílohy

### Příloha 1: Seznam publikací, prezentací a plakátových sdělení

#### Publikace:

Dufková V.; Čabala R.; Ševčík V.: Determination of C5 - C12 perfluoroalkyl carboxylic acids in river water samples in the Czech Republic by GC-MS after SPE preconcentration, *Chemosphere*, in press, doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.12.029 (2012)

Dufková V.; Čabala R.; Maradová D.; Štícha M.: A fast derivatization procedure for gas chromatographic analysis of perfluorinated organic acids, *J. Chromatogr. A* **1216**, 8659-8664 (2009)

Dufková V.; Čabala R.: Fast Derivatization Method for Analysis of Perfluorinated Organic Acids by GC, příspěvek ve sborníku 5<sup>th</sup> *ISC Modern Analytical Chemistry*, ISBN 978-80-86561-41-7 (2009)

Dufková V.; Čabala R.: Retention of isobutyl esters of perfluorinated carboxylic acids on various stationary phases – ve stadiu přípravy

#### Přednášky:

Dufková V.: Development of the Method for Determination of Perfluorinated Organic Acids in Environmental Samples, seminář katedry Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik Univerzity Regensburg, 10.6.2011

Dufková V.: Fast Derivatization Method for Analysis of Perfluorinated Organic Acids by GC, 5<sup>th</sup> *ISC Modern Analytical Chemistry*, 22.9.2009

#### Plakátová sdělení:

Dufková V.; Čabala R.: Stanovení perfluorovaných organických kyselin (C5 – C12) ve vodných vzorcích ČR metodou GC-MS s SPE prekoncentrací, 63. zjazd chemikov, Tatranské Matliare, Slovensko, 5. – 9.9.2011

Dufková V.; Čabala R.: Retention of isobutyl esters of perfluorinated carboxylic acids on various stationary phases and their thermodynamic parameters on RTX-200MS column, 16<sup>th</sup> International Symposium on Separation Sciences, Řím, Itálie, 6.9. – 10.9.2010

Dufková V.; Čabala R.: Fast derivatization procedure for gas chromatographic analysis of perfluorinated organic acids, 15<sup>th</sup> International Conference ISSS Siofok, Maďarsko, 2. – 4.9. 2009

Dufková V.; Čabala R.: Fast Derivatization Method for Analysis of Perfluorinated Organic Acids by GC, 17<sup>th</sup> International Conference, Analytical methods and Human Health, Nový Smokovec, Slovensko 20. – 23.10.2008

Dufková V.; Čabala R.: Fast Derivatization Method for Analysis of Perfluorinated Organic Acids by GC, Chiranal, Olomouc, ČR, 24. – 27.6.2007



Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](#)

Chemosphere

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chemosphere](http://www.elsevier.com/locate/chemosphere)



Determination of C<sub>5</sub>–C<sub>12</sub> perfluoroalkyl carboxylic acids in river water samples in the Czech Republic by GC–MS after SPE preconcentration

Veronika Dufková, Radomír Čabala\*, Václav Ševčík

Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, Albertov 6, 128 43 Prague 2, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:  
Received 28 September 2011  
Received in revised form 9 December 2011  
Accepted 12 December 2011  
Available online xxx

Keywords:  
Perfluoroalkyl carboxylic acids  
River water samples  
SPE  
Isobutyl chloroformate  
Gas chromatography

ABSTRACT

A method employing solid phase extraction followed by gas chromatography–mass spectrometry with negative chemical ionization has been developed for determination of ultratrace concentrations of perfluoroalkyl carboxylic acids in river water. The effects of the experimental parameters, such as the pH, additions of NaCl and an ion-pairing agent (tetraethylammonium bromide) and the kind of the elution agent, on the efficiency of the test acid extraction have been studied. The analyte extraction recoveries and the limits of detection and determination have been found. The method developed has been tested on determinations of perfluoroalkyl carboxylic acids in the waters of the two largest Czech rivers, Vltava and Labe (Elbe). The best extraction results have been attained without any alteration of the sample pH, with an addition of tetrabutylammonium bromide (a concentration of 50 µg mL<sup>−1</sup> in the sample) and using methanol as the elution agent. Under these conditions, the recoveries of the test acids in the spiked real samples are within ranges from 60% to 104% and 53% to 111% for analyte concentration levels of 1.40 ng mL<sup>−1</sup> and 0.14 ng mL<sup>−1</sup>, respectively, depending on the lengths of the perfluorinated chains of the acids. In general, the recovery decreases with increasing length of this chain. The method developed exhibits very low limits of detection and determination and the results are fully comparable with those obtained when using more expensive HPLC–MS/MS instrumentation. Typical values amount to tenths to tens of pg mL<sup>−1</sup> and units to one hundred pg mL<sup>−1</sup> for the limits of detection and determination, respectively; the measuring sensitivity increases with increasing length of the analyte chain. The analyzes of real samples from the Vltava and Elbe rivers have demonstrated that the results obtained are similar to the values published for contamination of the Elbe and other rivers in western and central Europe. The concentrations determined are of the order of units to tens of pg mL<sup>−1</sup> and the C<sub>8</sub>–C<sub>10</sub> acids occur most often.

© 2011 Published by Elsevier Ltd.

**Abbreviations:** GC–EI–MS, gas chromatography–mass spectrometry with electron impact ionization; GC–NCl–MS, gas chromatography–mass spectrometry with negative chemical ionization; EPA, US Environmental Protection Agency; PFCA, perfluoroalkyl carboxylic acid (C<sub>n</sub>HF<sub>2n−1</sub>O<sub>2</sub>); PFDA, 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,12,12,12-tricosafuorododecanoic acid (perfluorododecanoic acid, CAS 335-76-2); PFDoA, 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,12,12,12-tricosafuorododecanoic acid (perfluorododecanoic acid, CAS 307-55-1); PFHpA, 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,7-tridecafluoroheptanoic acid (perfluoroheptanoic acid, CAS 375-85-9); PFHxA, 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,6,6-undecafluorohexanoic acid (perfluorohexanoic acid, CAS 307-24-4); PFNA, 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-heptadecafluorononanoic acid (perfluorononanoic acid, CAS 375-95-1); PFPeA, 2,2,3,3,4,4,5,5,5-nonafluoropentanoic acid (perfluoropentanoic acid, CAS 2706-90-3); PFOA, 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-pentadecafluorooctanoic acid (perfluorooctanoic acid, CAS 335-67-1); PFOS, 1,1,2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-heptadecafluorooctane-1-sulfonic acid (perfluorooctane sulfonic acid, CAS 1763-23-1); PFUnA, 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-heneicosafuoroundecanoic acid (perfluoroundecanoic acid, CAS 2058-94-8).

\* Corresponding author. Tel.: +420 221951228; fax: +420 221951236.  
E-mail address: [cabala@natur.cuni.cz](mailto:cabala@natur.cuni.cz) (R. Čabala).

0045-6535/\$ - see front matter © 2011 Published by Elsevier Ltd.  
doi:[10.1016/j.chemosphere.2011.12.029](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.12.029)

Please cite this article in press as: Dufková, V., et al. Determination of C<sub>5</sub>–C<sub>12</sub> perfluoroalkyl carboxylic acids in river water samples in the Czech Republic by GC–MS after SPE preconcentration. Chemosphere (2012), doi:[10.1016/j.chemosphere.2011.12.029](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.12.029)

The applicability of this approach has been tested on water samples collected in the two largest rivers of the Czech Republic, the Vltava and Labe (Elbe) rivers, whose contamination with perfluorinated acids can be expected. Another aim of this paper is the finding whether and how much are the Czech Republic river waters contaminated with PFCAs, which have not yet been determined in this country.

Perfluoroalkyl carboxylic acids (PFCAs) belong to a group of purely anthropogenic chemicals with unique physical, chemical and biological properties, closely related to their high-energy carbon – fluorine bonds ( $485 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) (de Voogt and Sáez, 2006). PFCAs with a typical structure of  $\text{F}-(\text{CF}_2)_n-\text{COOH}$ , where  $n = 1-13$ , are resistant to hydrolysis, photolysis, biodegradation and to metabolic processes in living organisms (Tseng et al., 2006). Additionally, they are both water- and fat-repellent (“supersurfactants”) and thus are widely used for treatment of textiles (rain gear, e.g., Goretex®) and paper, in paints, lubricants, polishes, adhesives, grease repellents in popcorn bags and food-wrapper coatings, wiring insulation for telecommunications, insecticide formulations and fire-fighting foams and in the photographic and the semi-conductor industries (Martin et al., 2002; Kaiser et al., 2005; Mawn et al., 2005; Powley et al., 2005; González-Barreiro et al., 2006; Villagrasa et al., 2006). In particular, PFOA is used as adjuvant in the production of fluoropolymers such as PTFE, Teflon® or similar products, and occur in these applications as aqueous and gaseous process emissions (Davis et al., 2007; Loos et al., 2008). Their emissions over the period from 1951 to 2004 have been estimated to amount to 3200–7300 tons (van Leeuwen and de Boer, 2007; Prevedouros et al., 2006) and they are globally distributed in the environment. Owing to their classification as environmentally persistent, bioaccumulative and potentially harmful substances (Li, 2009), EPA and eight major industrial companies launched the 2010/15 PFOA Stewardship Program in 2006, in which they are committed to reduce the global emissions and the contents of PFOA and related chemicals in their products by 95% in 2010, and to work toward complete elimination of the emissions and the product content by 2015 (Jin et al., 2009; US Environmental Protection Agency, 2010).

In contrast to other classical persistent contaminants (POPs), PFCAs are primarily liberated into water and thus are accumulated in surface and subsurface waters. Water is the main reservoir of these substances in the environment and the principal medium for their transport (Prevedouros et al., 2006; McLachlan et al., 2007; Loos et al., 2008).

A great number of publications thus deal with these topics and the present work is also directed toward this part of the environment. Several typical papers discussing the problems of determination of PFCAs in surface and ground waters are summarized below.

A set of 34 various organic contaminants, primarily involving PFCAs ( $\text{C}_7-\text{C}_{12}$ ), was monitored in samples collected along the whole length of the Danube river, using the SPE–HPLC–MS/MS method (Loos et al., 2010a). The highest concentration,  $20 \text{ pg mL}^{-1}$ , was found for PFOA. The same authors further monitored the occurrence of selected perfluoroalkyl substances in 164 samples of ground waters collected in 23 countries all over Europe (Loos et al., 2010b). PFOA was found in 66% of the samples, with a maximum concentration of  $39 \text{ pg mL}^{-1}$ ; PFHpA occurred in 30% of the samples, its highest concentration equaling  $21 \text{ pg mL}^{-1}$ .

The  $\text{C}_7-\text{C}_{11}$  analytes, PFCA and PFOS, were determined in selected parts of the Po river (Italy) and in its main tributaries (Loos et al., 2008). The highest concentration,  $1300 \text{ pg mL}^{-1}$ , were found for PFOA in the Tánaro river close to the town of Alessandra. In the mouth of the river into the Adriatic Sea, the degree of contamination with PFOA ranged from 60 to  $174 \text{ pg mL}^{-1}$ .

Ahrens et al. (2009) monitored various polyfluoroalkyl compounds including PFCAs ( $\text{C}_4-\text{C}_{12}$ ) along the Elbe river in Germany

and in the North Sea. PFOA predominated among the PFCAs, with concentrations from  $2.9$  to  $12.5 \text{ pg mL}^{-1}$ . Clara et al. (2009) dealt with the occurrence of PFCAs ( $\text{C}_6-\text{C}_{12}$ ) in the Austrian hydrological system. The highest concentration observed in surface waters was  $21 \text{ pg mL}^{-1}$  of PFOA. The sediments of seven Alpine lakes and that of the Danube river were also studied. All the Danube sediment samples contained PFHxA, PFHpA and PFOA at concentrations of  $0.1-5.1 \text{ ng g}^{-1}$  (dry weight).

Altogether 40 polyfluoroalkyl chemicals including PFCA were monitored in the Rhine river water, from Lake Constance to the river mouth into the North Sea. The predominant PFCA was PFBA with concentrations of up to  $335 \text{ pg mL}^{-1}$  (Möller et al., 2010). Nakayama et al. (2010) applied the SPE–UPLC–MS/MS method to the monitoring of PFCAs ( $\text{C}_4-\text{C}_{12}$ ) in the surroundings of the Mississippi river. The highest concentration was found for PFBA,  $458 \text{ pg mL}^{-1}$ , PFOA being another important contaminant with the highest concentration equal to  $125 \text{ pg mL}^{-1}$ . Furdul et al. (2008) determined PFCAs ( $\text{C}_7-\text{C}_{11}$ ) in the waters of the USA Great Lakes using the HPLC–MS/MS method without any preconcentration step. PFOA were found in all the lakes, at a minimum concentration of  $10 \text{ pg mL}^{-1}$ ; the highest PFOA concentrations were found in the Lake Ontario, close to the outlet of a wastewater treatment plant. Samples of seawater from the South American Guanabara Bay contained PFOA at concentrations from  $0.7$  to  $3.25 \text{ pg mL}^{-1}$  (Quinete et al., 2009).

Samples of surface and drinking waters from several Chinese regions were analyzed using the SPE–HPLC–MS/MS method (Jin et al., 2009). Two principal perfluoroalkyl pollutants, PFOA and PFOS, were determined, the medians of the maximum PFOA concentrations in surface waters amounting to  $0.3$  ( $1.3$ )  $\text{pg mL}^{-1}$  ( $n = 13$ ) in empty countryside and to  $3.9$  ( $30.8$ )  $\text{pg mL}^{-1}$  ( $n = 22$ ) in inhabited areas. Kunacheva et al. (2009) monitored the occurrence of PFOA and PFOS in Thailand rivers passing through industrial regions. The average PFOA concentration, determined by the SPE–HPLC–MS/MS method, was  $4.7 \text{ pg mL}^{-1}$ .

Perfluoroalkyl compounds were determined in river, lake, beach sea and drainage waters in India (Yeung et al., 2009). The highest PFOA concentration,  $23.1 \text{ pg mL}^{-1}$ , was found in the Cooum river in Chennai. PFOA, PFHxA and PFNA were present in 55%, 43% and 40% of all the samples, respectively. No acid with a high perfluoroalkyl chain ( $\text{C}_{11}-\text{C}_{14}$ ) was found in the samples.

Gas chromatographic methods have also been applied to determination of PFCAs in the environment. A determination of PFCAs in water and sediments using SPME followed by GC–NCI–MS has been published by Alzaga and Bayona (2004). The PFCAs were derivatized to obtain the appropriate methyl and butyl esters directly on the SPME fiber in the injection compartment. The limits of detection for PFDA and PFOA amounted to  $20$  and  $100 \text{ pg mL}^{-1}$ , respectively. PFOA and PFDA were detected in samples of waste water and their concentrations were in ranges of  $0.34-4.32 \text{ ng mL}^{-1}$  for PFOA and  $0.5-8.2 \text{ ng mL}^{-1}$  for PFDA. According to our experience, a drawback of this technique lies in a substantial shortening of the lifetime of the SPE fiber used. Another GC–MS technique published is analysis for unsaturated PFCAs and PFOA, derivatized to benzyl esters by treatment with benzyl bromide, in fish tissues and the Rhine river water (Orata et al., 2009). The LOQ values for PFOA amounted to  $0.2 \text{ ng mL}^{-1}$  in water samples and  $0.3 \text{ µg g}^{-1}$  for fish tissue samples.

PFCAs have also been found in matrices other than water, e.g., in human serum and mother milk (Kannan et al., 2004; Houde et al., 2006; Midasch et al., 2007; Kärrman et al., 2007) or in tissues of living organisms coming from all parts of the world, involving arctic regions (Giesy and Kannan, 2001; Martin et al., 2004). It can be concluded that the whole global environment is subject to smaller or greater contamination with PFCAs.



The present paper aims at demonstrating that GC–MS methods are sufficiently sensitive and suitable for determination of very low concentrations of PFCAs in real samples and thus can be applied, in addition to the commonly used HPLC–MS/MS procedures. Therefore, the conditions for the SPE preconcentration of PFCAs have been studied which make it possible to determine the acid trace concentrations in real samples by GC–MS with negative chemical ionization. The applicability of this approach has been tested on water samples collected in the two biggest rivers of the Czech Republic, the Vltava and Elbe rivers, whose contamination with PFCAs can be expected.

## 2. Experimental

### 2.1. Standards and reagents

The following substances were used as the analytical standards: perfluoropentanoic acid (PFPeA, 97%), perfluoroheptanoic acid (PFHpA, 95%) perfluorooctanoic acid (PFOA, 95%), perfluorononanoic acid (PFNA, 97%), perfluorodecanoic acid (PFDA, 98%), perfluoroundecanoic acid (PFUnA, 95%), perfluorododecanoic acid (PFDoA, 95%), all from Aldrich, Germany and perfluorohexanoic acid (PFHxA, <95%, Fluka, Germany). All the other chemicals, acetonitrile (<99.5%, Fluka), hexane (99%, Mallinckrodt Baker B.V., Netherlands), methanol (99.9%, Rotisolv HPLC, Carl Roth, Germany), tetrabutylammonium bromide (98%, Fluka), isobutyl chloroformate (98%) and pyridine (99%), both from Aldrich, isobutyl alcohol and phosphoric acid (both p.a., Penta, Czech Republic) and water (18.2 MΩ, Milli-Q Plus, Millipore) were used, as received.

The standard PFCA substances were dissolved in acetonitrile to prepare standard stock solutions of 10000 µg mL<sup>−1</sup>.

### 2.2. Instruments

The GC–NCI–MS analyzes were performed using a GCMS-QP2010 Plus instrument (Shimadzu, Japan), equipped with a 30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness Rtx-200MS column (Restek, USA). Helium (99.999%, Linde, Czech Republic) was used as the carrier gas at a constant linear flow rate of 40 cm s<sup>−1</sup>. Splitless-mode injection (sample volume, 1 µL) at 250 °C was employed (split valve closed for 1 min). The oven temperature was maintained at 40 °C for 3 min, ramped at 10 °C min<sup>−1</sup> to 150 °C, then ramped at 30 °C min<sup>−1</sup> to 200 °C min<sup>−1</sup> and then maintained for 2 min (total run time, 17.67 min). The mass spectrometer was operated in the selected ion monitoring (SIM) mode at specific *m/z* values for each PFCA (see Table 5 in Supplementary information). The MS transfer line was maintained at 210 °C.

The GC–EI–MS analyzes were performed using a GCMS-GP5050A instrument (Shimadzu, Japan), equipped with a 30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness DB-5MS column (Agilent Technologies, USA). Helium (99.999%, Linde) was used as the carrier gas at a constant linear flow rate of 40 cm s<sup>−1</sup>. Splitless-mode injection (sample volume, 1 µL) at 250 °C was employed (split valve closed for 1 min). The oven temperature was held at 40 °C for 3 min, ramped at 10 °C min<sup>−1</sup> to 170 °C and then held for 3 min (total run time, 19 min). The mass spectrometer was operated in the selected ion monitoring (SIM) mode at *m/z* values 69, 131, 169 and 181 and the transfer line maintained at 300 °C. Total ion current (TIC) of all the *m/z* values monitored was used for quantification of individual analytes.

### 2.3. Sample collection

The real samples of water were collected at three sites along the Vltava river (the Moldau river) in Prague, in the period from September 2010 to January 2011. Site A was located at Výtň, un-

der the railway bridge in the center of Prague, site B was at Troja bridge, ca. 9000 m downstream from site A and ca. 1500 m upstream from the main outlet of the Central Wastewater Cleaning Plant (CWCP), site C was ca. 500 m downstream from the CWCP outlet. The average flow rates of the river (m<sup>3</sup> s<sup>−1</sup>) on the sample collection dates: 7th November 2010–104, 9th December 2010–129 and 4th January 2011–173 (official data of the Czech Hydrometeorological Institute). The samples were collected 50 cm under the water level into 1.5 L PE bottles.

All the Elbe river samples were collected within 1 d, on 8th January 2011, at six collection sites along the whole length of the river in the Czech Republic, namely, at Vrchlabí, Pardubice, Mělník-Kly, Štětí, Ústí nad Labem and Děčín. The river flow rates (m<sup>3</sup> s<sup>−1</sup>) for these sites at the above date 2.52 – Vrchlabí, 92.1 – Pardubice, 364 – Mělník, 429 – Ústí nad Labem, 448 – Děčín. The samples were transported to the laboratory immediately after their collection and were maintained in cold and dark. Prior to their treatment, they were brought to laboratory temperature and filtered through a membrane filter (47 mm in diameter, 0.45 µm, Whatman, Maidstone, UK).

### 2.4. Sample pretreatment by SPE

Three 250 mL portions were taken from each sample and were transferred into polypropylene vessels. Volumes of 100 µL of an aqueous tetrabutylammonium bromide solution with a concentration of 125 g L<sup>−1</sup> were added to the vessels, thus obtaining its final concentration of 50 µg mL<sup>−1</sup>. These sample solutions were subjected to SPE procedure on Supel-Select HLB SPE columns (6 mL, 200 mg, Supelco, Bellefonte, USA); the columns were preconditioned by passage of 6 mL of methanol followed by 10 mL of deionized water at a flow rate of one drop per second. The sample solution was passed through the column using polypropylene tubing, at a rate of 1 to 2 drops per second (an underpressure of ca. 0.4 bar) and the column was dried by passage of the air for 30 min. The analytes were then manually eluted by 4 mL of methanol into a 15 mL polypropylene screw-cap tube, at a rate of one drop per second. The manual elution with an injection syringe piston inserted into the column was necessitated by the fact that the commercial Supelco manifold contained PTFE seals contaminating the samples with PFCAs (see below). The eluate was then evaporated to dryness by an air stream at 64 °C and the residue was dissolved in 625 µL of acetonitrile. This corresponds to a preconcentration factor of 400 (the original sample volume was 250 mL). A bi-distilled water blank was treated in the same way, in parallel with sets of samples (up to five samples in one set).

### 2.5. Derivatization procedure

The standard PFCAs were derivatized in 0.5 mL polypropylene (PP) microvials (Eppendorf) by gradually adding 4 µL of pyridine, 8 µL of isobutyl alcohol and 10 µL of isobutyl chloroformate (IBCF) to 178 µL of the appropriately diluted acetonitrile solution of the PFCA mixture, thus making the reaction mixture overall volume equal to 200 µL. The mixture was stirred for 20 s in an ultrasound (ultrasonic) bath, maintained quiet for 8 min, 200 µL of hexane were then added and the isobutyl esters formed were extracted into them by shaking for 1 min. The upper hexane layer was collected into vials for the GC–MS analysis (Dufková et al., 2009).

With the real and blank samples, a 178 µL portion of the 625 µL volume of the reconstituted SPE eluate (Section 2.4) was derivatized by the same procedure as that used with the PFCAs standards.

### 2.6. Calibration, LOD and LOQ

Two PFCAs calibration series were obtained, one for the GC–EI–MS measurements within a concentration range from 1 to

100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , in order to find suitable SPE conditions, and the other, within a range from 0.5 to 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , for GC–NCI–MS determinations of PFCAs in real samples. To determine instrumental LOD and LOQ values of GC–NCI–MS method, the signal-to-noise ( $S/N$ ) values were used for the peak areas corresponding to the lowest concentrations of the acid esters and these values were recalculated to the ester concentrations corresponding to the  $S/N$  ratios of 3 (LOD) and 10 (LOQ). The LOD and LOQ values for the whole method were then obtained for the individual analytes by including the preconcentration factor and the efficiency of the SPE step (see below).

### 2.7. Recovery of SPE

The recovery experiments were performed with bidistilled water and the river water samples collected at site A during September and October 2010. With all the analytes, the samples were spiked to two different levels, 1.40  $\text{ng mL}^{-1}$  and 0.14  $\text{ng mL}^{-1}$ , and the concentrations experimentally found were compared with the theoretical ones, thus obtaining the real recoveries. To ensure the accuracy and precision of the recovery determination, the values measured by the above-mentioned method were compared with those obtained by a method using  $^{13}\text{C}_4$ -PFOA as the internal standard (the data not shown). The results of the both methods were found to be statistically equal ( $t$ -test,  $\alpha = 0.05$ ) within the measuring precision.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Sample contamination

The blank samples were contaminated with some PFCAs, at a level of a few tens of nanograms, during the SPE elution step performed in the commercial SPE manifold. The SPE manifold, containing fluorinated plastic materials, was identified as the main source of this contamination. The manifold parts containing these sources of contamination were extracted with 10 mL of methanol for 10 min in an ultrasound bath. The methanol was then evaporated, the residue dissolved in acetonitrile, derivatized in the same way as the other samples and analyzed by the GC–NCI–MS method, finding 19 ng of PFOA, 8 ng of PFNA, 9 ng of PFDA, 7 ng of PFUnA and 6 ng of PFDoA.

To prevent this contamination, the analytes were eluted from the SPE column manually, without using the manifold (Section 2.4). Blank samples prepared by this procedure do not exhibit any detectable contamination.

### 3.2. Development of the SPE procedure

This procedure, based on the paper by Weremiuk (Weremiuk et al., 2006), was studied using the GC–MS method with electron ionization. The authors of this paper determined the extraction recoveries for 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  concentrations of PFCAs ( $\text{C}_6$ – $\text{C}_{12}$ ) standards in 250 mL of bidistilled water without any change in the pH of the samples. Unfortunately, the results obtained in the present paper were substantially poorer.

The reasons for this were apparently manifold:

- The SPE columns used were obtained from different manufacturers (Supelco vs. Waters).
- The residue after evaporation of the elution agent was dissolved in acetonitrile in the present work, in contrast to Ref. (Weremiuk et al., 2006) which used a 1:1 mixture of  $10^{-2}$  M ammonium acetate and acetonitrile both as the residue solvent and the mobile phase for the subsequent HPLC–MS/MS procedure.

- The fact that the procedure in Ref. (Weremiuk et al., 2006) was optimized for only PFOA and PFOS, whereas the present one involved the whole homologous series of the  $\text{C}_6$ – $\text{C}_{12}$  acids, may also play a role in the recovery differences.

The recoveries obtained in the present work ranged between 7% (PFHxA) and 91% (PFDA), the recovery decreasing with decreasing length of the acid chain. For PFOA, a recovery of 68% was obtained, in contrast to the value, 99–100%, reported in Ref. (Weremiuk et al., 2006). Consequently, the SPE procedure for PFOA (Weremiuk et al., 2006) was modified as follows.

#### 3.2.1. Optimization of the pH

The pH values of three standard solutions of PFCAs (250 mL, solute concentration, 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) were adjusted to 1.5, 2.0 and 3.0. The acidic region was selected in order to suppress dissociation of the acids (e.g.,  $\text{pK}_a = 2.6$  for PFOA, see data sheet Sigma-Aldrich), to support the analyte interaction with the solid phase in the SPE column. The changes in the pH did not improve the recoveries and the decrease in the pH value actually led to poorer recoveries (see Fig. 1). The best results were obtained for the original samples whose pH equaled 4.1 and thus any pH adjustments were avoided.

#### 3.2.2. Selection of the elution agent

Methanol and acetonitrile were tested using elution volumes of 4 and 8 mL. No significant differences were found and thus 4 mL volumes of methanol were used further on.

#### 3.2.3. Additions of sodium chloride and/or tetrabutylammonium bromide

The extraction recovery can be affected by manipulation with the solution ionic strength (salting-out effects). Therefore, solutions of PFCAs (250 mL, 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) were mixed with NaCl solutions (48, 56, 64 and 72  $\text{g L}^{-1}$ ). The addition of NaCl improved the recoveries of  $\text{C}_6$ – $\text{C}_9$  acids, but decreased those of the  $\text{C}_{10}$ – $\text{C}_{12}$  ones. The optimum value for the whole acid group is 56  $\text{g L}^{-1}$  NaCl (see Fig. 2). However, the solid residue obtained after evaporation of the aqueous solution is difficult to dissolve in acetonitrile prior to derivatization step, even if the derivatization itself is unaffected (the data not shown).

Another possibility of affecting the extraction is the formation of ion pairs. Tetrabutylammonium bromide (TBABr) was selected as the ion-pairing agent, at concentrations of 25, 50, 75 and 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . It can be seen in Fig. 3 that the highest increase in the SPE recovery occurs with TBABr concentrations of 50 and 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The reason for the values greater than 100% with PFHxA is at present unclear. The value, 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  was selected for further

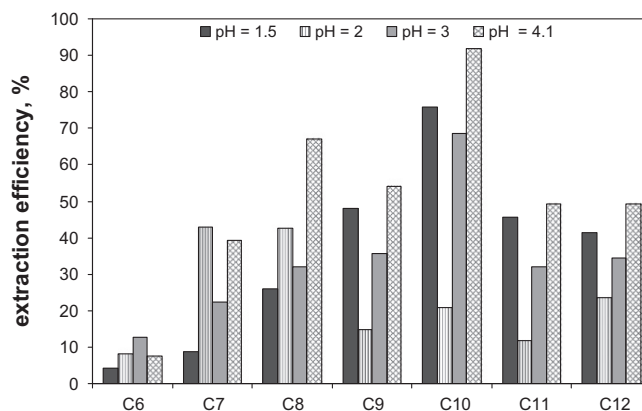


Fig. 1. Dependence of the SPE recovery of perfluoroalkyl carboxylic acids on the pH of their aqueous solutions.

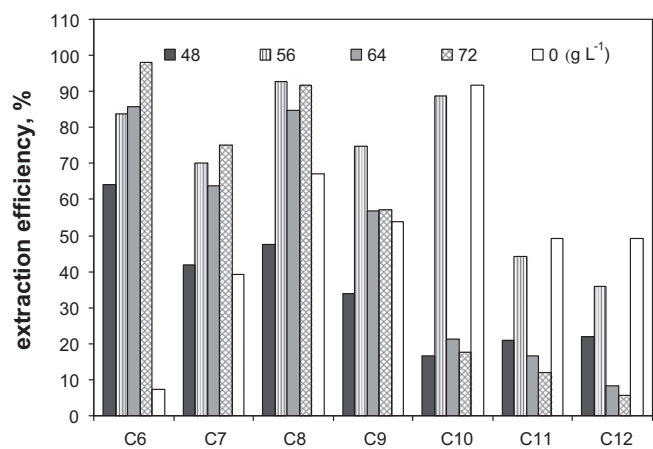


Fig. 2. Dependence of the SPE recovery of perfluoroalkyl carboxylic acids on the NaCl addition.

use (for determinations of PFOA alone, a concentration of 100 µg mL<sup>-1</sup> should be preferred, as the SPE recovery is above 90%). If NaCl and TBABr are added together, their favourable effects are not enhanced, but, on the other hand, decreased. Considering the unfavourable effects of NaCl (see above), it was decided to use only the TBABr addition. Therefore, the original SPE technique described in Ref. (Weremiuk et al., 2006) was modified by an addition of TBABr at a concentration of 50 µg mL<sup>-1</sup>.

3.3. SPE of river water samples

To enhance the sensitivity of determination, all the gas chromatographic measurements were carried out using negative chemical ionization. Perfluoropentanoic acid (PFPeA) was added to the set of the analytes in these measurements. Three samples of the Vltava river water (collection sites A, B and C) were spiked with a mixture of C<sub>5</sub>–C<sub>12</sub> PFCAs, to attain their concentrations of 1.40 and 0.14 ng mL<sup>-1</sup>, TBABr was then added to attain its concentration of 50 µg mL<sup>-1</sup> and a volume of 250 mL of the resultant solution was subjected to the SPE procedure. The SPE eluates were then analyzed by the GC–NCI–MS method. All the measurements were carried out in triplicate, the results for the unspiked and spiked samples were evaluated and the SPE efficiency values were obtained (see Table 1). The efficiencies vary within 53–111%, the acids with shorter chains (C<sub>5</sub>–C<sub>8</sub>) generally exhibiting approximately 100% efficiency, whereas those with longer chains (C<sub>9</sub>–C<sub>12</sub>) yielding efficiencies be-

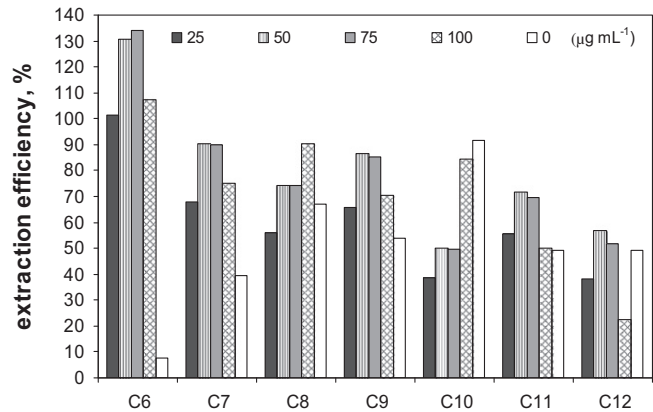


Fig. 3. Dependence of the SPE recovery of perfluoroalkyl carboxylic acids on the TBABr addition.

low 86% (see Fig. 3 and Table 1). The t-test ( $\alpha = 0.05$ ,  $n = 3$ ) indicates that the efficiency values do not differ statistically for the two PFCAs concentrations. The efficiency values obtained by this procedure do not differ statistically (t-test,  $\alpha = 0.05$ ) from those measured using <sup>13</sup>C-PFOA as the internal standard. This result makes it possible to eliminate the very expensive <sup>13</sup>C-labeled PFOA standard from the analytical procedure and to extend the use of the method to more laboratories.

The results obtained for PFPeA and PFHxA also demonstrate that there is no problem with the efficiency values exceeding 100% at these low concentrations, as the SPE values obtained in analyzes of standards dissolved in distilled water (during the optimization of the SPE procedure by GC–EI–MS) cannot be directly compared with those for river water (measured by GC–NCI–MS), due to the differences in the experimental and instrumental conditions (see above). To determine the PFCAs concentrations in real river water samples, the SPE values obtained for the lower spike, 0.14 ng mL<sup>-1</sup>, were employed because this is closer to the river water concentrations.

The LOD and LOQ values were determined as described in Section 2.6, the only difference being that the S/N ratios were computed for the *m/z* values with the predominant intensity (Table 5 in Supplementary information). The results for the river water are listed in Table 2.

Very low LOD and LOQ values, of the order of tenths to units of pg mL<sup>-1</sup> (ppt), were obtained for PFCAs with longer chains. The highest sensitivity was attained for PFNA – a LOD of 0.1 pg mL<sup>-1</sup>. On the other hand, the LOD and LOQ values for the acids with shorter chains are one or two orders of magnitude higher. Compared to the results obtained using the GC–EI–MS method (Dufková et al., 2009), the present measurements are more sensitive and the LOD and LOQ values are lower by two or three orders of magnitude. Therefore, the present approach is sufficiently sensitive for PFCAs determination in real water samples, at concentrations of units of pg mL<sup>-1</sup> (ppt).

3.4. The Vltava river samples

The results obtained for the samples of the Vltava river water collected at three sites in Prague during three months are summarized in Table 3. All the samples contained PFOA and PFNA within concentration ranges from 4 (LOD) to 28 and 1 to 4 pg mL<sup>-1</sup>, respectively. No increase in the PFCAs concentrations was observed downstream from CWCP; therefore, the Prague wastewaters are probably not a source of additional contamination with perfluorinated acids at the sampling time period. The average concentration at sites A, B and C at a given sample collection time yields the average PFOA mass flux in the Vltava river; these values were 2.5, 1.1 and 1.3 mg s<sup>-1</sup> on the 7th November 2010, 9th December 2010 and 4th January 2011, respectively.

The results obtained for the samples collected in November 2010 are interesting. High concentrations of PFHxA were found,

Table 1				
The SPE efficiencies for the individual PFCAs in spiked Moldau river water samples.				
Acid	Spike level 1.40 ng mL <sup>-1</sup>		Spike level 0.14 ng mL <sup>-1</sup>	
	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
PFPeA	102	7	99	4
PFHxA	100	6	111	6
PFHpA	98	5	100	5
PFOA	104	6	103	6
PFNA	86	10	66	3
PFDA	79	6	67	1
PFUnA	65	5	60	4
PFDoA	60	3	53	10

**Table 2**  
The LOD and LOQ values for PFCAs determination in river water using the SPE–GC–NCI–MS (SIM) method.

Acid	Lowest concentration in calibration (ng mL <sup>−1</sup> )	LOD (pg mL <sup>−1</sup> )	LOQ (pg mL <sup>−1</sup> )	S/N RSD (%)
PFPeA	40	24	81	6.3
PFHxA	8	6	19	8.0
PFHpA	8	5	16	8.8
PFOA	8	4	12	1.4
PFNA	2	0.1	0.4	0.3
PFDA	2	0.3	1	8.3
PFUnA	2	0.5	2	6.1
PFDoA	2	0.5	2	9.5

S/N RSD (%) – relative standard deviation of signal-to-noise ratio.

especially upstream from CWCP – 298 pg mL<sup>−1</sup> in all the three samples collected at this site; the concentration downstream from this site was mere 51 pg mL<sup>−1</sup>. This indicates that the occurrence of the PFCAs contamination may be very irregular and thus the location of the sources may be difficult. The November collection also demonstrated the highest concentrations of PFOA and PFNA, probably caused by the fact that the river water was not diluted by melting snow as happens in December and January. The results obtained for the occurrence of PFCAs in the nine samples collected at the three sites in November are as follows: 0, 22, 100, 44, 11%, for PFPeA, PFHxA and PFHpA, PFOA and PFNA, PFDA, PFUnA and PFDoA. The high RSD values for some analytes are due to differences in the automated software integration of the analyte peaks with intensities close to the signal noise. All the blanks used were uncontaminated. An example of the real sample chromatogram is given in Fig. 4 in Supplementary information.

3.5. The Elbe river samples

The Elbe river samples were collected at six sites on 8th January 2011 and were treated in the same way as the Vltava river samples. Similar to the Vltava river, PFOA and PFNA were found in all the samples, at concentrations of 4 (LOD) to 17 and 0.1 to 2 pg mL<sup>−1</sup>, respectively. In addition, PFDA was present in all the samples, at a concentration of 1 to 10 pg mL<sup>−1</sup>. The remaining PFCAs occurrences were 0, 17, 67, 83 % for PFPeA, PFHxA, PFHpA and PFUnA, PFDoA, respectively. The value, 17.1 pg mL<sup>−1</sup> is the highest concentration of PFOA in the Elbe samples, at the Děčín site where the Elbe river leaves the Czech Republic and enters Germany. Similar to the Vltava river samples, the occurrence of PFCAs with shorter chains is lower. On the other hand, surprisingly high concentrations of C<sub>9</sub>–C<sub>12</sub> PFCAs were found in the samples collected in the upper part of the Elbe river, in Vrchlabí, at the southern border of the Giant Mountains National Park. Downstream

**Table 4**  
The PFCAs concentrations (pg mL<sup>−1</sup>) in the Elbe river samples collected at six sites on the 8th of January 2011.

Acid	PFCAs concentrations (pg mL <sup>−1</sup> ) in the Elbe river					
	Vrchlabí	Pardubice	Kly	Štětí	Ústí nad Labem	Děčín
PFPeA	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
PFHxA	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD
PFHpA	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ
PFOA	<LOQ	<LOQ	<LOQ	12 (–)	<LOQ	17 (15)
PFNA	2 (19)	<LOQ	1 (–)	3 (25)	0.4 (14)	2 (27)
PFDA	4 (39)	4 (27)	2 (33)	5 (–)	1 (29)	10 (25)
PFUnA	6 (–)	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	3 (32)
PFDoA	14 (9)	<LOD	7 (32)	4 (8)	5 (–)	11 (2)

The RSD values (%) are given in the parentheses.

from this site, the concentrations of all the PFCAs decreased to values of units of pg mL<sup>−1</sup> or lower (except for PFOA). These measurements thus cannot confirm the fact that the PFCAs concentration increases downstream along the river and with increasing density of industrial enterprises. The measuring errors are sometimes rather high, for the same reasons as those mentioned for the Vltava river. Another cause lies in the fact that blank contamination (with C<sub>9</sub>–C<sub>12</sub> acids) was higher, in spite of thorough cleaning of the vessels with methanol. Therefore, some measurements had to be excluded from the treatment of the results and thus some RSD values are missing because a single measured value was used. The results are summarized in Table 4 and an example chromatogram of the Elbe river water is depicted in Fig. 5 in Supplementary information.

4. Conclusions

The results obtained have demonstrated that the SPE–GC–NCI–MS method developed is fully comparable with the published procedures employing substantially more expensive and less readily available HPLC–MS–MS instrumentation, as far as the sensitivity of the PFCAs determination is concerned. The GC methods published previously are only suitable for analyzes of seriously contaminated samples and their sensitivity is insufficient for measurements on real samples with contaminant concentrations of the order of pg mL<sup>−1</sup>. According to sources available to us, our procedure is most sensitive for PFCAs among all the GC methods published and is suitable for determinations of ultratrace concentrations in river waters and thus also for monitoring of their contamination. The procedure employs commonly available laboratory equipment and procedures, does not require isotopically labeled standards and thus is suitable for common analytical laboratories. Its originality is not in the use of new approaches and techniques, but in a fine tuning and interconnection of com-

**Table 3**  
The PFCAs concentrations (pg mL<sup>−1</sup>) in Vltava river samples collected at three sites in Prague.

Acid	PFCAs concentrations (pg mL <sup>−1</sup> ) in the Vltava river								
	7th November 2010			9th December 2010			4th January 2011		
	A City centre	B Over WWTP	C Under WWTP	A City centre	B Over WWTP	C Under WWTP	A City centre	B Over WWTP	C Under WWTP
PFPeA	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
PFHxA	<LOD	298 (9)	51 (20)	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
PFHpA	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOQ	<LOD
PFOA	28 (6)	19 (13)	24 (14)	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
PFNA	3 (18)	4 (14)	2 (4)	1 (12)	2 (8)	3 (1)	2 (14)	1 (14)	2 (1)
PFDA	12 (38)	<LOD	<LOD	5 (35)	4 (21)	4 (18)	<LOD	<LOD	<LOD
PFUnA	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	7 (19)	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
PFDoA	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	9 (15)	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

The relative standard deviations (%) are in the parentheses, CWCP – Central Wastewater Cleaning Plant.

Please cite this article in press as: Dufková, V., et al. Determination of C<sub>5</sub>–C<sub>12</sub> perfluoroalkyl carboxylic acids in river water samples in the Czech Republic by GC–MS after SPE preconcentration. Chemosphere (2012), doi:10.1016/j.chemosphere.2011.12.029



mon principles leading to the attainment of a high measuring sensitivity at relatively low costs of the determination.

During the development of the method, it has been found that one of the critical points of the PFCAs analysis is contamination of the samples caused by wide use of instrumentation containing parts made of poly- and perfluorinated materials. The extent of this contamination may attain values similar to the analyte contents in real samples. Therefore, these contaminating materials must be strictly excluded from the whole process of sample collection, treatment and analysis.

The PFCAs concentrations found in the Vltava and Elbe waters are the first ones published for the Czech Republic rivers and are roughly comparable with the values found earlier for rivers in central and western Europe (Ahrens et al., 2009; Clara et al., 2009; Loos et al., 2010a,b; Möller et al., 2010).

Acknowledgments

The support by Projects No. 40908 and SVV 2011-263204 of the Grant Agency of the Charles University, Research Projects MSM 0021620857 and RP 14/63 of the Ministry of Education, Youth and Sports, Research Project IAAX00100903 of Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic and the Project No. CZ0116 of the Norwegian Financial Mechanism is gratefully acknowledged.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.chemosphere.2011.12.029.

References

Ahrens, L., Plassmann, M., Xie, Z., Ebinghaus, R., 2009. Determination of polyfluoroalkyl compounds in water and suspended particulate matter in the river Elbe and North Sea, Germany. *Front. Environ. Sci. Eng. China* 3 (2), 152–170.

Alzaga, R., Bayona, J.M., 2004. Determination of perfluorocarboxylic acids in aqueous matrices by ion-pair solid-phase microextraction-in-port derivatization-gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry. *J. Chrom. A* 1042, 155–162.

Buck, R.C., Franklin, J., Berger, U., Conder, J.M., Cousins, I.T., de Voogt, P., Jensen, A.A., Kannan, K., Marbury, S.A., van Leeuwen, S.P.J., 2011. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: terminology, classification, and Origins. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 7, 513–541.

Clara, M., Gans, O., Weiss, S., Sanz-Escribano, D., Scharf, S., Scheffknecht, C., 2009. Perfluorinated alkylated substances in the aquatic environment: an Austrian case study. *Water Res.* 43, 4760–4768.

Davis, K.L., Aucoin, M.D., Larsen, B.S., Kaiser, M.A., Hartten, A.S., 2007. Transport of ammonium perfluorooctanoate in environmental media near a fluoropolymer manufacturing facility. *Chemosphere* 67, 2011–2019.

de Voogt, P., Sáez, M., 2006. Analytical chemistry of perfluoroalkylated substances. *Trends Anal. Chem.* 25, 326–342.

Dufková, V., Čabala, R., Marádová, D., Štícha, M., 2009. A fast derivatization procedure for gas chromatographic analysis of perfluorinated organic acids. *J. Chromatogr. A* 1216, 8659–8664.

Furdui, V.I., Crozier, P.W., Reiner, E.J., Mabury, S.A., 2008. Trace level determination of perfluorinated compounds in water by direct injection. *Chemosphere* 73, S24–S30.

Giesy, J.P., Kannan, K., 2001. Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife. *Environ. Sci. Technol.* 35, 1339–1342.

González-Barreiro, C., Martínez-Carballo, E., Sitka, A., Scharf, S., Gans, O., 2006. Method optimization for determination of selected perfluorinated alkylated substances in water samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 386, 2123–2132.

Houde, M., Martin, J.W., Letcher, R.J., Salomon, K.R., Muir, D.C.G., 2006. Biological Monitoring of Polyfluoroalkyl Substance: a review. *Environ. Sci. Technol.* 40, 3463–3473.

Jin, Y.H., Liu, W., Sato, I., Nakayama, S.F., Sasaki, K., Saito, N., Tsuda, S., 2009. PFOS and PFOA in environmental and tap water in China. *Chemosphere* 77, 605–611.

Kaiser, M.A., Larsen, B.S., Kao, C.C., Buck, R.C., 2005. Vapor pressures of perfluorooctanoic, -nonanoic, -decanoic, -undecanoic, and -dodecanoic Acids. *J. Chem. Eng. Data* 50, 1841–1843.

Kannan, K., Corsolini, S., Falandysz, J., Fillmann, G., Kumar, K.S., Loganathan, B.G., Mohd, M.A., Olivero, J., Van Wouwe, N., Yang, J.H., Aldous, K.M., 2004. Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in human blood from several countries. *Environ. Sci. Technol.* 38, 4489–4495.

Kärman, A., Ericson, I., van Bavel, B., Darnerud, P.O., Aune, M., Glynn, A., Lignell, S., Lindström, G., 2007. Exposure of perfluorinated chemicals through lactation: levels of matched human milk and serum and a temporal trend, 1996–2004, in Sweden. *Environ. Health Perspect.* 115, 226–230.

Kunacheva, C., Boontanon, S.K., Fujii, S., Tanaka, S., Musirat, C., Artsalee, C., Wongwattana, T., 2009. Contamination of perfluorinated compounds (PFCs) in Chao Phraya River and Bangpakong River, Thailand. *Water Sci. Technol.* 60, 975–982.

Li, M.-H., 2009. Toxicity of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid to plants and aquatic invertebrates. *Environ. Toxicol.* 24, 95–101.

Loos, R., Locoro, G., Huber, T., Wollgast, J., Christoph, E.H., de Jager, A., Gawlik, B.M., Hanke, G., Umlauf, G., Zaldívar, J.-M., 2008. Analysis of perfluorooctanoate (PFOA) and other perfluorinated compounds (PFCs) in the River Po watershed in N-Italy. *Chemosphere* 71, 306–313.

Loos, R., Locoro, G., Contini, S., 2010a. Occurrence of polar organic contaminants in the dissolved water phase of the Danube River and its major tributaries using SPE–LC–MS2 analysis. *Water Res.* 44, 2325–2335.

Loos, R., Locoro, G., Comero, S., Contini, S., Schwesig, D., Werres, F., Balsaa, P., Gans, O., Weiss, S., Blaha, L., Bolchi, M., Gawlik, B.M., 2010b. Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. *Water Res.* 44, 4115–4126.

Martin, J.W., Muir, D.C.G., Moody, C.A., Ellis, D.A., Kwan, W.C., Solomon, K.R., Mabury, S.A., 2002. Collection of airborne fluorinated organics and analysis by gas chromatography/chemical ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* 74, 584–590.

Martin, J.W., Smithwick, M.M., Braune, B.M., Hoekstra, P.F., Muir, D.C.G., Mabury, S.A., 2004. Identification of long-chain perfluorinated acids in biota from the Canadian Arctic. *Environ. Sci. Technol.* 38, 373–380.

Mawn, M.P., McKay, R.G., Ryan, T.W., Szostek, B., Powley, C.R., Buck, R.C., 2005. Determination of extractable perfluorooctanoic acid (PFOA) in water, sweat simulant, saliva simulant, and methanol from textile and carpet samples by LC/MS/MS. *Analyst* 130, 670–678.

McLachlan, M., Holmström, K.E., Reth, M., Berger, U., 2007. Riverine discharge of perfluorinated carboxylates from the European continent. *Environ. Sci. Technol.* 41, 7260–7265.

Midasch, O., Drexler, H., Hart, N., Beckmann, M.W., Angerer, J., 2007. Transplacental exposure of neonates to perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate: a pilot study. *Int Arch Occup Environ Health* 80, 643–648.

Möller, A., Ahrens, L., Surm, R., Westerveld, J., van der Wielen, F., Ebinghaus, R., de Voogt, P., 2010. Distribution and sources of polyfluoroalkyl substances (PFAS) in the River Rhine watershed. *Environ. Pollut.* 158, 3243–3250.

Nakayama, S.F., Strynar, M.J., Reiner, J.L., Delinsky, A.D., Lindström, A.B., 2010. Determination of perfluorinated compounds in the Upper mississippi river basin. *Environ. Sci. Technol.* 44, 4103–4109.

Orata, F., Quinete, N., Wilken, R.-D., 2009. Long chain perfluorinated alkyl acids derivatisation and identification in biota and abiota matrices using gas chromatography. *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 83, 630–635.

Powley, C.R., Michalczyk, M.J., Kaiser, M.A., Buxton, L.W., 2005. Determination of perfluorooctanoic acid (PFOA) extractable from the surface of commercial cookware under simulated cooking conditions by LC/MS/MS. *Analyst* 130, 1299–1302.

Prevedourous, K., Cousins, I.T., Buck, R.C., Korzeniowski, S.H., 2006. Sources, Fate and Transport of Perfluorocarboxylates. *Environ. Sci. Technol.* 40, 32–44.

Quinete, N., Wub, Q., Zhang, T., Yun, S.H., Moreira, I., Kannan, K., 2009. Specific profiles of perfluorinated compounds in surface and drinking waters and accumulation in mussels, fish, and dolphins from southeastern Brazil. *Chemosphere* 77, 863–869.

Sigma-Aldrich. <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/DisplayMSDSContent.do>>.

Tseng, C.L., Liu, L.L., Chen, C.M., Ding, W.H., 2006. Analysis of perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in water and biological tissue samples by liquid chromatography–ion trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1105, 119–126.

US Environmental Protection Agency (EPA), 2010. Perfluorooctonoic Acid (PFOA) and Fluorinated Telomers: 2010/2015 PFOA Stewardship program. <<http://www.epa.gov/oppt/pfoa/index.html>>.

van Leeuwen, S.P.J., de Boer, J., 2007. Extraction and clean-up strategies for the analysis of poly- and perfluoroalkyl substances in environmental and human matrices. *J. Chromatogr. A* 1153, 172–185.

Villagrasa, M., López de Alda, M., Barceló, D., 2006. Environmental analysis of fluorinated alkyl substances by liquid Chromatography–(tandem) mass spectrometry: a review. *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006), 953–972.

Weremiuk, A.M., Gerstmann, S., Frank, H., 2006. Quantitative determination of perfluorinated surfactants in water by LC–ESI–MS/MS. *J. Sep. Sci.* 29, 2251–2255.

Yeung, L.W.Y., Yamashita, N., Taniyasu, S., Lam, P.K.S., Sinha, R.K., Borole, D.V., Kannan, K., 2009. A survey of perfluorinated compounds in surface water and biota including dolphins from the Ganges River and in other waterbodies in India. *Chemosphere* 76, 55–62.

Please cite this article in press as: Dufková, V., et al. Determination of C<sub>5</sub>–C<sub>12</sub> perfluoroalkyl carboxylic acids in river water samples in the Czech Republic by GC–MS after SPE preconcentration. *Chemosphere* (2012), doi:10.1016/j.chemosphere.2011.12.029



## A fast derivatization procedure for gas chromatographic analysis of perfluorinated organic acids

Veronika Dufková<sup>a</sup>, Radomír Čabala<sup>a,\*</sup>, Doubravka Maradová<sup>a</sup>, Martin Štícha<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Albertov 6, 128 43 Prague 2, Czech Republic

<sup>b</sup> Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Albertov 6, 128 43 Prague 2, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 18 August 2009

Received in revised form 6 October 2009

Accepted 13 October 2009

Available online 20 October 2009

#### Keywords:

Perfluorinated organic acids

Isobutyl chloroformate

Gas chromatography

### ABSTRACT

A rapid and simple derivatization procedure has been developed for gas chromatographic determination of perfluorinated organic acids (PFCAs, C<sub>6</sub>–C<sub>12</sub>), using isobutyl chloroformate (IBCF) to convert the acids into the more volatile isobutyl esters, under catalysis by pyridine. The procedure was optimized in an acetonitrile medium and applied to GC techniques with electron-capture detection (GC-ECD) and mass spectrometry with electron-impact ionization (GC-EI-MS); for the sake of comparison, HPLC with electrospray-ionization MS (HPLC-ESI(–)-MS) was also tested. The LOD and LOQ values obtained for these three techniques were compared, and the lowest LODs were obtained with GC-ECD (0.06–1.80 µg mL<sup>–1</sup>). The procedure was further optimized in an aqueous medium, obtaining the best results in a phosphate buffer (pH 2.5, 50 mmol L<sup>–1</sup>), in which the LOD and LOQ values were measured for GC-ECD a GC-EI-MS. The lowest LODs were found for GC-EI-MS (0.030–0.314 µg mL<sup>–1</sup>). The practical applicability was tested on Vltava river water samples.

Crown Copyright © 2009 Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Perfluorinated organic acids (PFCAs) have recently received much attention because they belong to the group of ubiquitous environmental contaminants [1,2]. PFCAs with a typical structure of F–(CF<sub>2</sub>)<sub>n</sub>–COOH, where *n* = 1–13, have unique physical, chemical and biological properties, closely related to their high-energy carbon–fluorine bonds [3]. They are resistant to hydrolysis, photolysis, biodegradation and to metabolic processes in living organisms [4]. These properties make them both water- and fat-repellent (“supersurfactants”) and thus they have been used for treatment of textiles and paper, in paints, lubricants, polishes, PTFE precursors, food packages, insecticide formulations, fire-fighting foams, and in the photographic and the semi-conductor industries [5–11]. The emissions of PFCAs over the period from 1951 to 2004 have been estimated to amount to 3200–7300 tonnes [12,13]. They are globally distributed, environmentally persistent, bioaccumulative and potentially harmful [14]. In 2005, EPA's science advisory board recommended that the agency classify perfluorooctanoic acid (PFOA) as a “likely” human carcinogen [15].

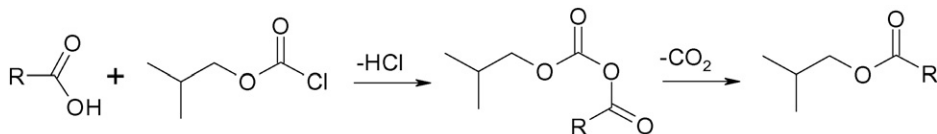
Analyses for PFCAs are now mostly carried out by means of HPLC-MS(–MS) to meet the requirements of high sensitivity and selectivity [16–20]. However, many laboratories are not equipped for this method and would prefer readily available GC techniques.

PFCAs should theoretically be directly determinable by GC because they are sufficiently volatile, but their chromatographic peaks exhibit pronounced tailing, owing to their high polarity. Consequently, the analytes are converted into more volatile and less polar derivatives using various procedures. The published works describe their derivatization to the methyl esters by the reactions with diazomethane [21,22], methyl iodide [23] and with a methanolic solution of BF<sub>3</sub> [25]. Alzaga and Bayona [24] published a GC-NCI-MS technique for the determination of PFCAs employing an ion-pair extraction of their tetrabutylammonium salts, followed by their thermal decomposition on a SPME fiber producing the appropriate butyl esters. This approach has an advantage in the combination of the preconcentration and derivatization steps. Scott et al. [26,27] describe a less common procedure for the PFCAs derivatization, involving the conversion of C<sub>2</sub>–C<sub>9</sub> acids into the corresponding 2,4-difluoroanilides by the reaction with 2,4-difluoroaniline in the presence of *N,N*-dicyclohexylcarboimide, followed by their GC–MS determination.

The procedure proposed by us in the present paper employs the esterification of PFCAs due to the reaction with alkylchloroformates, which has not yet been published for PFCAs derivatization. The works of Husek et al. [28–32] describe conversions of various acids, e.g., fatty, oxo-, amino-, or phenolic acids, into various alkyl esters, using the acid reactions with alkylchloroformates. A great advantage of these reactions lies in the possibility of performing them in aqueous media which makes it possible to use them for direct derivatization of biological samples, e.g., those of blood plasma or urine. The alkyl is first bound to the acid, with liberation

\* Corresponding author. Tel.: +420 221951228; fax: +420 221951236.  
E-mail address: [cabala@natur.cuni.cz](mailto:cabala@natur.cuni.cz) (R. Čabala).

of hydrochloric acid and the formation of the labile acid anhydride which rapidly decarboxylates and provides the ester and carbon dioxide. Pyridine is used as the catalyst and the corresponding alkyl alcohol sometimes serves as an auxiliary agent. For isobutyl chloroformate and a perfluorinated acid, the reaction scheme can thus be written in the form,



where R is the perfluorinated acid chain. In addition to the isobutyl esters, small amounts of several volatile compounds are formed which, however, do not interfere in the following analytical procedure. Isobutyl esters have been selected because of their optimum volatility. For example, the methyl esters of PFCAs with shorter chains are too volatile and elute too rapidly from GC columns.

The present work aims at development of a very rapid, simple and reliable derivatization procedure based on the above reaction scheme, to be followed by a GC determination of the PFOA isobutyl esters. The method operates with microliter samples and thus can be considered as an economically and ecologically advantageous micromethod. In combination with an efficient preconcentration technique it should be suitable for PFOA determination in environmental samples; the development of suitable preconcentration and extraction techniques is the subject of our further research.

## 2. Experimental

### 2.1. Standards and reagents

The following substances were used as the analytical standards: perfluorohexanoic acid (PFHxA, <95%, Fluka, Steinheim, Germany), perfluoroheptanoic acid (PFHpA, <95%) perfluorooctanoic acid (PFOA, 95%), perfluorononanoic acid (PFNA, 97%), perfluorodecanoic acid (PFDA, 98%), perfluoroundecanoic acid (PFUnA, 95%) and perfluorododecanoic acid (PFDoA, 95%, all from Aldrich, Steinheim, Germany). All the other chemicals, acetonitrile (<99.5%, Fluka, Steinheim, Germany), hexane (99%, Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Netherlands), isobutyl chloroformate (98%, Aldrich, Steinheim, Germany), pyridine (99%, Aldrich, Steinheim, Germany), hydrochloric acid (35%, Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Czech Republic), ammonium acetate, isobutylalcohol, phosphoric acid, sodium hydroxide, sodium carbonate (all p.a., Penta, Chrudim, Czech Republic) and water (Milli-Q Plus, Millipore) were used as received.

The standard substances were dissolved in acetonitrile to prepare standard stock solutions of 10,000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  PFOA.

The buffer solutions (50  $\text{mmol L}^{-1}$ ) were prepared as follows: the pyridine buffer by dissolving the appropriate amount of pyridine in water; the phosphate buffer by adjusting the pH value of the aqueous  $\text{H}_3\text{PO}_4$  with 2  $\text{mol L}^{-1}$  NaOH; the carbonate buffer by adjusting the pH of the aqueous  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  with 1  $\text{mol L}^{-1}$  HCl.

### 2.2. Instruments

GC-ECD analyses were performed using a PU 4600 GC instrument (Unicam Analytical Systems, Cambridge, UK), equipped with a 15 m  $\times$  0.25 mm i.d., 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness SPB-5 column (Supelco, Bellefonte, USA). Splitless-mode injection (sample volume, 1  $\mu\text{L}$ ) at 250  $^{\circ}\text{C}$  (split valve closed for 1 min) and nitrogen carrier gas (flow rate, 0.44  $\text{mL min}^{-1}$ ) were used. The oven temperature was held for 1 min at 50  $^{\circ}\text{C}$ , ramped at 10  $^{\circ}\text{C/min}$  to 170  $^{\circ}\text{C}$  and then held for 5 min (total run time, 23 min). The detector temperature was maintained at 300  $^{\circ}\text{C}$ . The pressure of make-up nitrogen was 25 kPa.

GC-EI-MS analyses were performed using a GCMS-GP5050A instrument (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with a 30 m  $\times$  0.25 mm i.d., 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness DB-5MS column (Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Helium (99.999%, Linde) was used as the carrier gas with a flow rate of 1.0  $\text{mL min}^{-1}$ . Splitless-mode injection (sample volume, 1  $\mu\text{L}$ ) at 250  $^{\circ}\text{C}$  was

employed (split valve closed for 1 min). The oven temperature was held at 40  $^{\circ}\text{C}$  for 3 min, ramped at 10  $^{\circ}\text{C/min}$  to 170  $^{\circ}\text{C}$  and then held for 3 min (total run time, 19 min). The mass spectrometer was operated in the selected ion monitoring (SIM) mode at  $m/z$  values 69, 131, 169 and 181 and the transfer line maintained at 300  $^{\circ}\text{C}$ .

HPLC-ESI(–)-MS analyses were carried out using an Esquire 3000 instrument (ion trap MS, Bruker Daltonics, Bremen, Germany), with a C<sub>18</sub> ProntoSIL column (200 mm  $\times$  2.0 mm i.d., 3.0  $\mu\text{m}$ , Bishoff, Leonberg, Germany) and the mobile phase of acetonitrile, water and ammonium acetate (10  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 3.6) 55:15:30 with a flow rate of 0.220  $\text{mL min}^{-1}$ . Fragment ions at  $m/z$  269, 319, 369, 419, 469, 519 and 569 were monitored in the SIM mode. Volumes of liquids were measured either by Hamilton syringes or by Proline Biohit pipettors (Biohit Oyj, Finland).

### 2.3. Derivatization procedure

The reaction mixture for derivatization in the acetonitrile medium was prepared in a polypropylene (PP) vial by mixing 20  $\mu\text{L}$  of the 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  PFOA solution prepared by diluting the stock solution in acetonitrile, 158  $\mu\text{L}$  of acetonitrile, 8  $\mu\text{L}$  of isobutylalcohol, 4  $\mu\text{L}$  of pyridine and 10  $\mu\text{L}$  of isobutyl chloroformate (IBCF). The total volume of the reaction mixture was 200  $\mu\text{L}$  with the resultant PFOA concentration equal to 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The mixture was stirred for 20 s in an ultrasonic bath, 200  $\mu\text{L}$  of hexane was added and the isobutyl ester formed was extracted into hexane for 1 min in a shaker. The upper hexane phase was separated into a clean PP vial and injected onto the gas chromatographic column.

The derivatization procedure in the aqueous medium is very similar, the only differences being the dilution of the acetonitrile stock solution of PFOA with water to the 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  concentration, adding 161  $\mu\text{L}$  of a buffer solution with the required pH and concentration values instead of acetonitrile, and adding a certain amount of pyridine (see Section 3.3).

### 2.4. Sample preparation

Three real samples of river water, denoted as Vltava 1–3, were collected from the Vltava river at a site close to the Prague center, at a depth of 50 cm, into 1 L polypropylene vessels and filtered through a nylon membrane filter (47 mm in diameter, 0.45  $\mu\text{m}$ , Whatman, Maidstone, England). Their volume was decreased from 500 to 5 mL in a Rotavapor EL 130 (Büchi, Flawil, Switzerland) rotary evaporator and 17  $\mu\text{L}$  of concentrated phosphoric acid (85%) was added to the concentrate to attain a concentration of 50  $\text{mmol L}^{-1}$ . The pH was then adjusted to a value of 2.5 by adding a 2  $\text{mol L}^{-1}$  NaOH solution and the solution was centrifuged. The volume, 181  $\mu\text{L}$ , of this solution was subjected to the derivatization procedure, adding appropriate amounts of isobutyl alcohol, pyridine and IBCF (see Section 2.3). The mixture was extracted with 200  $\mu\text{L}$  of hexane and injected into the GC-EI-MS system.



### 2.5. Determination of LOD and LOQ values

Calibration dependences were obtained for perfluorinated acids, using the GC-ECD and GC-MS methods after the analyte derivatization to the isobutyl esters in the acetonitrile medium, over a range from 0.08 to 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , and for these acids without derivatization, using the HPLC-ESI(-)-MS method within a range from 0.8 to 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The LOD and LOQ values were computed as three- and ten-times, the standard deviation of the points of the calibration straight line, divided by the calibration straight line slope, respectively [33]. The values for PFHxA and PFUnA are missing, because the standard substances were not available.

The GC-ECD method calibration in the aqueous phosphate buffer medium (see Section 3.3) was carried out over an analyte concentration range from 0.02 to 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , except for PFHxA which was excessively volatile and coeluted with the large zone of IBCF; the coelution could not be prevented by changes in the temperature program. The six-point calibration of the GC-EI-MS method was obtained within an analyte concentration range from 0.02 to 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  range. The real samples of the Vltava river water (see Section 3.3) were evaluated in terms of these calibration dependences.

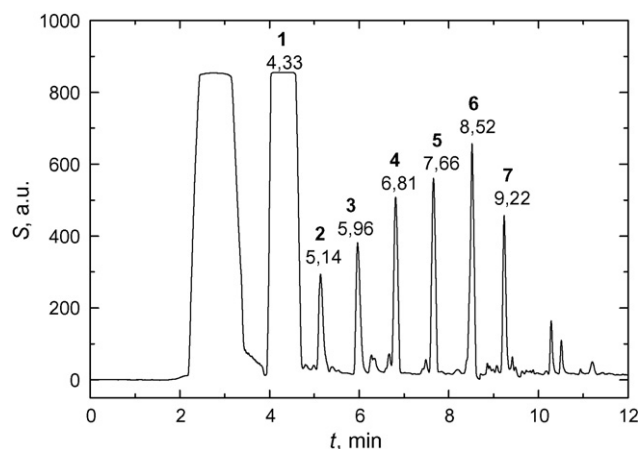
## 3. Results and discussion

### 3.1. Development of the derivatization procedure

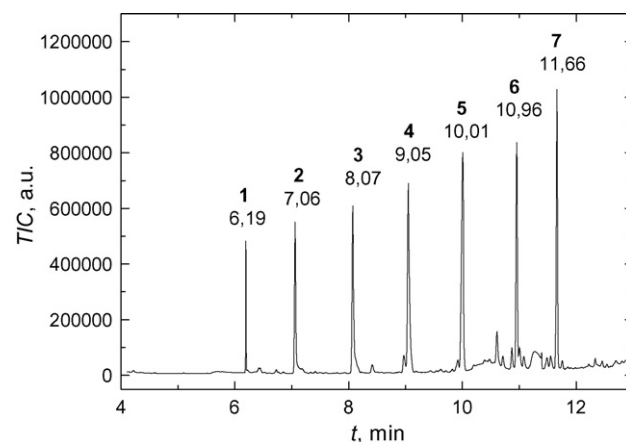
The derivatization reaction in the acetonitrile medium was optimized in several steps, in order to improve its efficiency and increase the sensitivity of analytical measurements. The duration of the reaction was varied within an interval from 0 to 50 min, finding the optimum value at 8 min. The optimum composition of the reaction mixture was then found to be 20  $\mu\text{L}$  of a perfluorinated acid standard (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) in acetonitrile, 158  $\mu\text{L}$  of acetonitrile, 8  $\mu\text{L}$  of isobutyl alcohol, 4  $\mu\text{L}$  of pyridine and 10  $\mu\text{L}$  of IBCF. In this step, the volume of pyridine was optimized within a range from 0 to 20  $\mu\text{L}$  per 200  $\mu\text{L}$  of the reaction mixture, which corresponds to the pyridine concentration range from 0 to 1.238  $\text{mol L}^{-1}$ . Variations in the volumes of the other components of the reaction mixture had negligible effects on the reaction course. Finally, the reaction temperature was optimized in the range from 20 to 60  $^{\circ}\text{C}$ , finding the lower limit to be suitable. This optimization improved the derivatization procedure efficiency by more than 60%, expressed in terms of the areas under the analyte chromatographic peaks. The reaction yield of the derivatization procedure is >99%. Repeated derivatization of the same sample followed by exhaustive extraction into hexane phase showed only traces (<0.7%) of PFCAs remaining in the aqueous phase.

Figs. 1 and 2 depict examples of GC-ECD and GC-EI-MS chromatograms of PFCAs ( $\text{C}_6$ – $\text{C}_{12}$ ) standards, derivatized to the isobutyl esters in acetonitrile under the optimum conditions. The large peak of IBCF in Fig. 1 obscures the coeluting ibu-PFHxA peak. No other coelution was observed during this work.

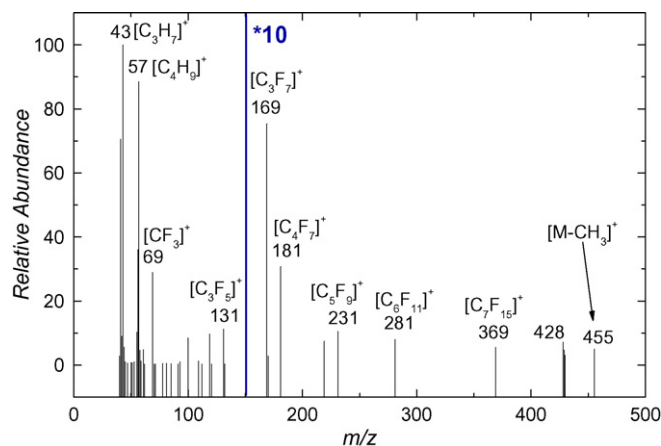
Some intense fragments appear repeatedly in the MS spectra of the isobutyl esters of perfluorinated acids; they are formed by splitting of the fluorinated chain (69  $[\text{CF}_3]^+$ , 131  $[\text{C}_3\text{F}_5]^+$ , 169  $[\text{C}_3\text{F}_7]^+$ , 181  $[\text{C}_4\text{F}_7]^+$ , 219  $[\text{C}_4\text{F}_9]^+$  etc.). Some of them are identified in Fig. 3 and can be used for quantitative analysis. Four most intense ones were selected for the measurement of the calibration dependences, namely,  $m/z$  69, 131, 169 and 181. In addition, the  $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$  fragments were employed for qualitative analysis. Ions 43 and 57 are also very intense fragments and correspond to isopropyl  $[\text{C}_3\text{H}_7]^+$  and isobutyl  $[\text{C}_4\text{H}_9]^+$ , respectively (one of them is always the basic peak).



**Fig. 1.** A GC-ECD chromatogram of a mixture of perfluorinated acid standards (10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of each) derivatized to isobutyl esters. An SPB-5 column (15 m  $\times$  0.25 mm i.d., 0.25  $\mu\text{m}$ ); a 1  $\mu\text{L}$  sample injected (splitless, 1 min); detector temperature, 300  $^{\circ}\text{C}$ ; injector temperature, 250  $^{\circ}\text{C}$ ; column temperature, 50  $^{\circ}\text{C}$  (1 min) to 170  $^{\circ}\text{C}$  (5 min) in 10  $^{\circ}\text{C/min}$ ; make-up gas pressure, 25 kPa, nitrogen flow rate, 0.44  $\text{mL min}^{-1}$ ; 1: IBCF, 2: ibu-PFHxA, 3: ibu-PFOA, 4: ibu-PFNA, 5: ibu-PFDA, 6: ibu-PFUnA, 7: ibu-PFDoA.



**Fig. 2.** A GC-EI-MS chromatogram of a mixture of perfluorinated acid standards (10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of each) derivatized to the isobutyl esters. A DB-5MS column (30 m  $\times$  0.25 mm i.d., 0.25  $\mu\text{m}$ ); a 1  $\mu\text{L}$  sample injected (splitless, 1 min); MS interface temperature, 300  $^{\circ}\text{C}$ ; injector temperature, 250  $^{\circ}\text{C}$ ; temperature program: 40  $^{\circ}\text{C}$  (3 min) to 170  $^{\circ}\text{C}$  (3 min) in 10  $^{\circ}\text{C/min}$ ; constant helium flow rate, 1.0  $\text{mL min}^{-1}$ ; SIM mode:  $m/z$  = 69, 131, 169 and 181; 1: ibu-PFHxA, 2: ibu-PFHxA, 3: ibu-PFOA, 4: ibu-PFNA, 5: ibu-PFDA, 6: ibu-PFUnA, 7: ibu-PFDoA.



**Fig. 3.** The mass spectrum (EI) of the PFOA isobutyl ester (for the measuring conditions see Fig. 2).



Two byproducts were identified by the GC–MS in scan mode—bis-isobutyl esters of ethandiodic and carbonic acid, which eluted at least 5 min after the last PFCA.

They are not observable in the SIM mode of GC–MS and in GC–ECD methods (esters are not halogenated).

### 3.2. A comparison of the limits of detection obtained by the GC–EI–MS, GC–ECD and HPLC–ESI(–)–MS analyses after derivatization in the acetonitrile medium

The LOD and LOQ values for PFCAs, listed in Table 1 for derivatization in the acetonitrile medium, are not sufficiently low for direct analyses of environmental samples. However, if a suitable preconcentration step were included, with a preconcentration factor of at least 100, then the detection limits would amount to units or tens of ppb and would correspond to PFCAs concentrations in real environmental samples [9,24,26]. The LOD and the LOQ values for PFCAs isobutyl esters are lowest for GC–ECD and amount to tenths or units of  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (the lowest value is  $0.06 \mu\text{g mL}^{-1}$  for PFOA). The results for GC–EI–MS are slightly poorer and those for HPLC–ESI(–)–MS are substantially higher (the LOD values between 1.3 and  $3.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

### 3.3. Derivatization reaction in aqueous medium

Preliminary measurements indicated that PFCAs derivatization in aqueous media needs optimization. One of the principal parameters is the pH value of the medium and thus various buffers were tested, within a pH range from 1 to 11, at a concentration of  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  (to adjust the lowest pH values,  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  HCl was used). These aqueous buffers replaced acetonitrile in the reaction mixture. The derivatization efficiency was evaluated in terms of the area under the PFOA GC–EI–MS peak (see Fig. 4).

The selection of the buffer compositions for this wide pH range was difficult, because the buffers could not contain any functional group which could be derivatized, e.g., the carboxyl or amino group, to avoid a decrease in the efficiency of the PFOA derivatization. Therefore, only simple inorganic buffers could be used. The phosphate buffer with a pH of 2.5 provided the best results (see Fig. 4).

A great decrease in the peak area was observed when using the pyridine buffer, apparently due to the pyridine excess which decreases the derivatization reaction efficiency (see below). The optimum pH value, 2.5, suggests that the derivatization proceeds most efficiently at pH values close to the  $\text{pK}_a$  value of PFOA. It follows from the works by Goss [34] and Burns et al. [35], dealing with the calculation of the  $\text{pK}_a$  value for PFOA, that this substance is not as acidic as considered in some previous publications [19,20]. The originally published value was  $\text{pK}_a < 0.5$ , whereas the newly reported values equal 2.8 [34] and 3.8 [35]. Higher  $\text{pK}_a$  values have also been reported for other perfluorinated acids ( $\text{C}_4$ – $\text{C}_{12}$ ) and thus it can be assumed that these substances will behave analogously in this phosphate buffer. The buffer concentration exerts no significant effect on the derivatization reaction; therefore, of the tested values, 1, 10, 50 and  $100 \text{ mmol L}^{-1}$ , the concentration

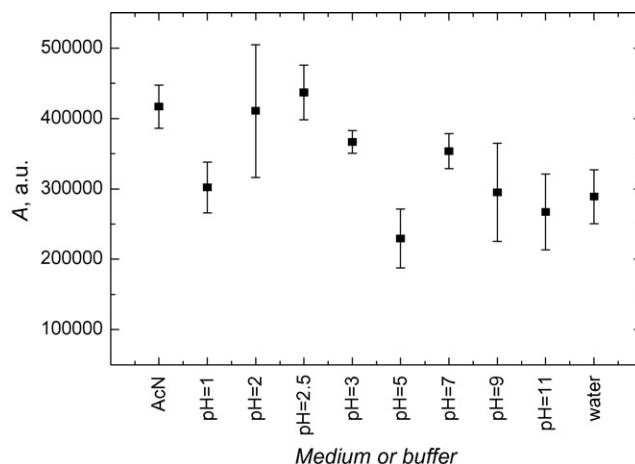


Fig. 4. Dependence of the area under the PFOA isobutyl ester GC–EI–MS peak on the pH values adjusted by various aqueous buffers. pH 1: HCl; pH 2, 2.5 and 3: a phosphate buffer; pH 5: a pyridine buffer; pH 7, 9 and 11: a carbonate buffer.

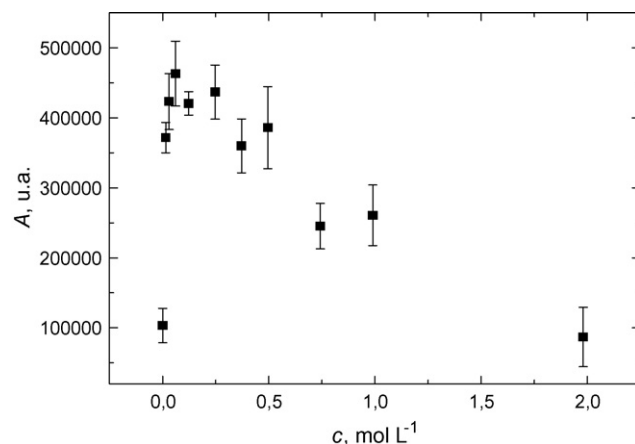


Fig. 5. Dependence of the area under the PFOA isobutyl ester GC–EI–MS peak on the pyridine concentration in the aqueous reaction mixture.

equal to  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  was further used. The amount of pyridine, as the reaction catalyst, was most important for the reaction yield in the acetonitrile medium. Therefore, the effect of the pyridine concentration was also investigated in the aqueous medium, within a range of  $0$ – $1.98 \text{ mol L}^{-1}$ , corresponding to the additions of  $0$ – $32 \mu\text{L}$  of pyridine to obtain the total volume of the reaction mixture,  $200 \mu\text{L}$ . It can be seen in Fig. 5 that the optimum pyridine amount equals  $1 \mu\text{L}$ , i.e. its concentration in the reaction mixture is  $0.06 \text{ mol L}^{-1}$ . The optimum pyridine amount for the reaction in acetonitrile medium is somewhat higher, namely,  $4 \mu\text{L}$ . In the absence of pyridine, the reaction efficiencies in the two media are negligible and thus the pyridine catalysis is necessary. For a detailed

**Table 1**  
Limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) for perfluorinated acids after their derivatization to the isobutyl esters in the acetonitrile medium obtained by the GC–ECD and GC–EI–MS methods and for the underivatized acids obtained by the HPLC–ESI(–)–MS method.

	GC–ECD		GC–EI–MS		HPLC–ESI(–)–MS	
	LOD ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	LOD ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	LOD ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
PFHxA	–	–	0.2	0.7	3.4	11.2
PFHpA	0.1	0.4	0.2	0.7	2.5	8.4
PFOA	0.1	0.2	0.4	1.4	1.8	6.0
PFNA	0.2	0.7	0.3	1.1	2.8	9.4
PFDA	1.8	2.7	1.9	6.4	3.0	10.1
PFUnA	–	–	2.2	7.3	1.3	4.5
PFDoA	0.2	0.5	0.6	2.0	2.0	6.5

discussion of the pyridine functioning in these reactions see the refs. [28–32].

When comparing the optimized PFCA derivatization in acetonitrile and in water, it can be seen that the area under the PFOA isobutyl ester GC-EI-MS peak, for the PFOA concentration,  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , equals  $417,000 \pm 30,800 \text{ a.u.}$  in the acetonitrile medium and  $460,000 \pm 46,400 \text{ a.u.}$  in the  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  aqueous phosphate buffer with a pH of 2.5. Therefore, the yield of the derivatization reaction is higher, by almost 10%, in the aqueous medium. Another advantage of the aqueous medium lies in the fact that the overall analytical procedure is much simpler, compared to the use of the non-aqueous system.

The GC-ECD and GC-MS techniques were again calibrated in the aqueous phosphate buffer, for analyte concentrations from 0.02 to  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . The HPLC-ESI(–)-MS technique could not be calibrated, because the phosphate buffer interfered with the electrospray functioning and a white film was formed in the electrospray space, suppressing the ionization and thus substantially decreasing the measuring sensitivity.

The published LOQs of HPLC-MS-MS methods for PFOA are below  $\text{ng/L}$  [16–20], for GC-EI-MS in the range from tenths to hundreds of  $\text{ng/L}$  [21–23,26,27] and for GC-NCI-MS in the range of hundredths to tens of  $\text{ng/L}$  [24,25]. These methods always include some preconcentration method.

The LOD and LOQ values for the perfluorinated acid isobutyl esters obtained after derivatization in the aqueous phosphate buffer are given in Table 2. Compared to the derivatization in the acetonitrile medium, these values are lower for the GC-EI-MS technique, within a range of  $0.03\text{--}0.31 \mu\text{g mL}^{-1}$ , compared to the GC-ECD values of  $0.15\text{--}0.73 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Higher LOD and LOQ values for GC-EI-MS were observed with acids containing higher numbers of carbon atoms ( $\text{C}_{10}\text{--}\text{C}_{12}$ ), probably due to the noise gradually increasing during the temperature gradient of the GC procedure. Therefore, the values for the lowest concentration,  $0.02 \mu\text{g mL}^{-1}$ , could not be evaluated for these compounds. The repeatability of the derivatization procedure expressed as the relative standard deviations ( $n=5$ ) for the LOD and LOQ values listed in Table 2 are smaller than 3% for GC-ECD and smaller than 6.6% for GC-MS.

#### 3.4. Testing of the application of the procedure

The optimized derivatization procedure in the aqueous medium was tested on three real samples of river water. A sample of distilled water spiked with a PFOA standard was analyzed in parallel. The GC-EI-MS method was used and the yield of the derivatization reaction was found to equal 64%. This preconcentration step is the simplest possible approach and does not require any sample purification. However, it represents only a preliminary step. The use of more sophisticated methods, e.g., solid-phase extraction, will probably yield better results.

In two samples (Vltava 1, Vltava 3), no perfluorinated acid was detected. The PFOA peak was found in the Vltava 2 sample, cor-

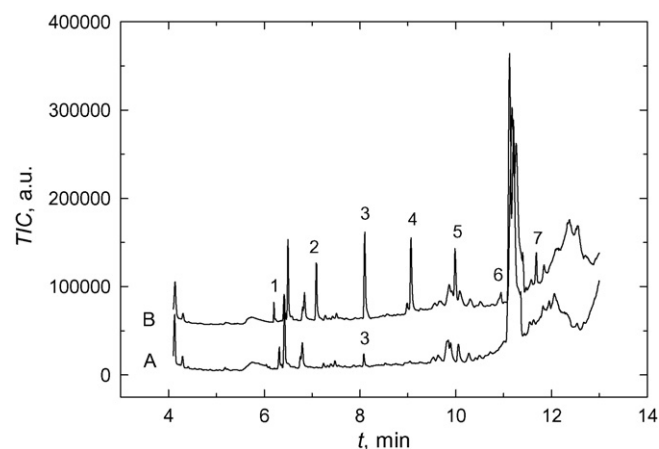


Fig. 6. GC-EI-MS chromatograms of the Vltava 2 sample (A) and of the Vltava 2 sample with PFCAs standards added (B) (the PFCAs concentration,  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ , for the measuring conditions see Fig. 2).

responding to the concentration,  $0.20 \mu\text{g mL}^{-1}$  in  $200 \mu\text{L}$  hexane, or  $3.4 \text{ ng mL}^{-1}$  in the sample. The chromatograms of the Vltava 2 sample prior (A) and after (B) the addition of PFCAs standards are given in Fig. 6.

#### 4. Conclusions

A rapid and simple micromethod has been developed for determination of perfluorinated acids ( $\text{C}_6\text{--}\text{C}_{12}$ ) by gas chromatography, after the analyte conversion into the isobutyl esters by the reaction with isobutyl chloroformate. The derivatization reaction has been optimized in the acetonitrile medium, obtaining LOD (LOQ) values of  $0.1\text{--}1.8$  ( $0.2\text{--}2.7$ )  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for GC-ECD,  $0.2\text{--}2.2$  ( $0.7\text{--}7.3$ )  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for GC-EI-MS and  $1.3\text{--}3.4$  ( $4.5\text{--}11.2$ )  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for HPLC-ESI-MS. The derivatization reaction has also been optimized in the medium of an aqueous phosphate buffer, with a pH of 2.5 and a concentration of  $50 \text{ mmol L}^{-1}$ , catalyzed by  $0.06 \text{ mol L}^{-1}$  pyridine. The reaction in the aqueous phosphate buffer had a yield higher by almost 10%, compared to that in the acetonitrile medium.

The LOD (LOQ) values obtained when using the aqueous phosphate buffer are in the ranges,  $0.2\text{--}0.7$  ( $0.5\text{--}2.4$ )  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for GC-ECD and  $0.03\text{--}0.31$  ( $0.1\text{--}1.05$ )  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for GC-EI-MS. These techniques have been applied to the determination of the PCFAs concentrations in three samples of the Vltava river water. None of these acids was found in two samples, while the third sample contained PFOA at a concentration of  $3.4 \text{ ng mL}^{-1}$  of the river water.

#### Acknowledgements

The financial support of this work by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (the Project No. VZ MSM 0021620857), by the Grant Agency of Charles University in Prague (the Project No. 40908) and by the Norwegian Financial Mechanism (the Project No. CZ0116) is gratefully acknowledged.

#### References

- [1] H. Hori, Y. Nagaoka, M. Murayama, S. Kutsuna, Environ. Sci. Technol. 42 (2008) 7438.
- [2] N. Yamashita, K. Kannan, S. Taniyasu, Y. Horii, T. Okazawa, G. Petrick, T. Gamo, Environ. Sci. Technol. 38 (2004) 5522.
- [3] P. de Voigt, M. Sáez, Trends Anal. Chem. 25 (2006) 326.
- [4] C.L. Tseng, L.L. Liu, C.M. Chen, W.H. Ding, J. Chromatogr. A 1105 (2006) 119.
- [5] C.R. Powley, M.J. Michalczyk, M.A. Kaiser, L.W. Buxton, Analyst 130 (2005) 1299.
- [6] C. González-Barreiro, E. Martínez-Carballo, A. Sitka, S. Scharf, O. Gans, Anal. Bioanal. Chem. 386 (2006) 2123.
- [7] M. Villagrasa, M. López de Alda, D. Barceló, Anal. Bioanal. Chem. 386 (2006) 953.

Table 2

The limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) for the PFCAs isobutyl esters after derivatization in the aqueous phosphate buffer obtained by the GC-ECD and GC-EI-MS techniques.

	GC-ECD		GC-EI-MS	
	LOD ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	LOD ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
PFHxA	–	–	0.15	0.49
PFHpA	0.3	1.1	0.06	0.19
PFOA	0.6	1.9	0.04	0.12
PFNA	0.2	0.5	0.03	0.10
PFDA	0.2	0.5	0.26	0.86
PFUnA	0.5	1.7	0.23	0.77
PFDoA	0.7	2.4	0.31	1.05

- [8] M.A. Kaiser, B.S. Larsen, C.C. Kao, R.C. Buck, J. Chem. Eng. Data 50 (2005) 1841.
- [9] A.M. Weremiuk, S. Gerstmann, H. Frank, J. Sep. Sci. 29 (2006) 2251.
- [10] J.W. Martin, D.C.G. Muir, C.A. Moody, D.A. Ellis, W.C. Kwan, K.R. Solomon, S.A. Mabury, Anal. Chem. 74 (2002) 584.
- [11] M.P. Mawn, R.G. McKay, T.W. Ryan, B. Szostek, C.R. Powley, R.C. Buck, Analyst 130 (2005) 670.
- [12] S.P.J. van Leeuwen, J. de Boer, J. Chromatogr. A 1153 (2007) 172.
- [13] K. Prevedouros, I.T. Cousins, R.C. Buck, S.H. Korzeniowski, Environ. Sci. Technol. 40 (2006) 32.
- [14] M.-H. Li, Environ. Toxicol. 24 (2009) 95.
- [15] R. Renner, Environ. Sci. Technol. 42 (2008) 648.
- [16] B.G. Loganathan, K.S. Sajwan, E. Sinclair, K.S. Kumar, K. Kannan, Water Res. 41 (2007) 4611.
- [17] J.W. Washington, W.M. Henderson, J.J. Ellington, T.M. Jenkins, J.J. Evans, J. Chromatogr. A 1181 (2008) 21.
- [18] V.I. Furdul, P.A. Helm, P.W. Crozier, C. Lucaciu, E.J. Reiner, C.H. Marvin, D.M. Whittle, S.A. Mabury, G.T. Tomy, Environ. Sci. Technol. 42 (2008) 4739.
- [19] A.M. Becker, S. Gerstmann, H. Frank, Chemosphere 72 (2008) 115.
- [20] M.K. So, Y. Miyake, W.Y. Yeung, Y.M. Ho, S. Taniyasu, P. Rostkowski, N. Yamashita, B.S. Zhou, X.J. Shi, J.X. Wang, J.P. Giesy, H. Yu, P.K.S. Lam, Chemosphere 68 (2007) 2085.
- [21] J. Belisle, D.F. Hagen, Anal. Biochem. 101 (1980) 369.
- [22] W.M. Henderson, E.J. Weber, S.E. Duirk, J.W. Washington, M.A. Smith, J. Chromatogr. B 846 (2007) 155.
- [23] C.A. Moody, J.A. Field, Environ. Sci. Technol. 33 (1999) 2800.
- [24] R. Alzaga, J.M. Bayona, J. Chromatogr. A 1042 (2004) 155.
- [25] R. Alzaga, C. Salgado-Pentinal, E. Jover, J.M. Bayona, J. Chromatogr. A 1083 (2005) 1.
- [26] B.F. Scott, C.A. Moody, C. Spencer, J.M. Small, D.C.G. Muir, S.A. Mabury, Environ. Sci. Technol. 40 (2006) 6405.
- [27] B.F. Scott, C. Spencer, S.A. Mabury, D.C.G. Muir, Environ. Sci. Technol. 40 (2006) 7167.
- [28] P. Husek, J. Chromatogr. B 717 (1998) 57.
- [29] P. Husek, P. Simek, P. Matucha, Chromatographia 58 (2003) 623.
- [30] P. Husek, P. Simek, Curr. Pharm. Anal. 2 (2006) 23.
- [31] P. Husek, P. Simek, E. Tvrzicka, Anal. Chim. Acta 465 (2002) 433.
- [32] P. Husek, Chromatographia 34 (1992) 621.
- [33] K. Danzer, H. Hobert, C. Fischbacher, K.-U. Jagemann, Chemometrik—Grundlagen und Anwendung, Springer, Berlin, 2001, p. 319.
- [34] K.-U. Goss, Environ. Sci. Technol. 42 (2008) 456.
- [35] D.C. Burns, D.A. Ellis, H. Li, C.J. McMurdo, E. Webster, Environ. Sci. Technol. 42 (2008) 9283.

# Fast Derivatization Method for Analysis of Perfluorinated Organic Acids by GC

VERONIKA DUFKOVÁ, RADOMÍR ČABALA

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague,  
Albertov 2030, 128 43 Prague 2, Czech Republic, zdufkova.k.v@volny.cz

## Keywords

derivatization  
gas chromatography  
isobutyl chloroformate  
perfluorinated organic acids  
water samples

## Abstract

A rapid and simple derivatization procedure has been developed for gas chromatographic determination of perfluorinated organic acids (PFCAs, C<sub>6</sub>–C<sub>12</sub>), using isobutyl chloroformate (IBCF) to convert the acids into the more volatile isobutyl esters, under catalysis by pyridine. Eight different capillary columns have been tested for separation of PFCAs isobutyl esters. The derivatization reaction has been optimized in acetonitrile medium and in aqueous phosphate buffer, with a pH = 2.5 and concentration of 50 mM. The reaction in aqueous phosphate buffer had yield higher by almost 10% compared to that in the acetonitrile medium. The LOD (LOQ) values obtained when using the aqueous phosphate buffer are in the ranges, 0.2–0.7 (0.5–2.4) µg/ml for GC-ECD and 0.03–0.31 (0.10–1.05) µg/ml for GC-EI-MS. The practical applicability was tested on Vltava river water samples.

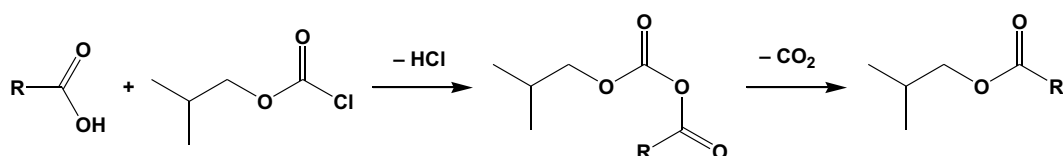
## 1. Introduction

Perfluorinated organic acids (PFCAs) have recently received much attention because they belong among ubiquitous environmental contaminants [1, 2]. PFCAs with a typical structure of F–(CF<sub>2</sub>)<sub>n</sub>–COOH, where *n* = 1–13, have unique physical, chemical and biological properties, closely related to their high-energy carbon-fluorine bonds [3]. They are resistant to hydrolysis, photolysis, biodegradation and to metabolic processes in living organisms [4]. These properties make them both water- and fat-repellent (“supersurfactants”) and thus they have been used for treatment of textiles and paper, in paints, lubricants, polishes, PTFE precursors, food packages, insecticide formulations, fire-fighting foams, and in the photographic and the semi-conductor industries [5–8]. The emissions of PFCAs over the period from 1951 to 2004 have been estimated to amount to 3200–7300 tons [9]. They are globally distributed, environmentally persistent, bioaccumulative and potentially harmful [10]. In 2005, EPA’s science advisory board recommended that the agency classify perfluorooctanoic acid (PFOA) as a “likely” human carcinogen [11].

Analyses for PFCAs are now mostly carried out by means of HPLC-MS(-MS) to meet the requirements of high sensitivity and selectivity [12, 13]. However, many laboratories are not equipped for this method and would prefer readily available GC techniques. PFCAs should theoretically be directly determinable by GC because they are sufficiently volatile, but their chromatographic peaks exhibit pronounced tailing, owing to their high

polarity. Consequently, the analytes are converted into more volatile and less polar derivatives using various procedures. The published works describe their derivatization to the methyl esters by the reactions with diazomethane [14, 15], methyl iodide [16] and with a methanolic solution of BF<sub>3</sub> [17]. Alzaga and Bayona [18] published a GC-NCI-MS technique for PFCAs determination employing an ion-pair extraction of their tetrabutylammonium salts, followed by their thermal decomposition on a SPME fiber producing the appropriate butyl esters. This approach has an advantage in the combination of the preconcentration and derivatization steps. Scott *et al.* [19, 20] describe a less common procedure for the PFCAs derivatization, involving the conversion of C<sub>2</sub> to C<sub>9</sub> acids into the corresponding 2,4-difluoroanilides by the reaction with 2,4-difluoroaniline in the presence of N,N-dicyclohexylcarbodiimide, followed by their GC-MS determination.

The proposed procedure employs esterification of PFCAs due to the reaction with alkyl chloroformates, which has not yet been published for PFCAs derivatization. The works of Hušek *et al.* [21–23] describe conversions of various acids, *e. g.*, fatty, oxo-, amino-, or phenolic acids, into various alkyl esters, using the acid reactions with alkyl chloroformates. A great advantage of these reactions lies in the possibility of performing them in aqueous media, which makes it possible to use them for direct derivatization of biological samples, *e. g.*, those of blood plasma or urine. The alkyl is first bound to the acid, with liberation of hydrochloric acid and the formation of the labile acid anhydride which rapidly decarboxylates and provides the



**Fig. 1.** Reaction scheme of derivatization of perfluorinated acid by isobutyl chloroformate; R is the perfluorinated alkyl chain.

ester and carbon dioxide. Pyridine is used as the catalyst and the corresponding alkyl alcohol sometimes serves as an auxiliary agent. For isobutyl chloroformate and a perfluorinated acid, the reaction scheme is depicted in Fig. 1. In addition to the isobutyl esters, small amounts of several volatile compounds are formed which, however, do not interfere in the following analytical procedure. Isobutyl esters have been selected because of their optimum volatility. For example, the methyl esters of PFCAs with shorter chains are too volatile and elute too rapidly from GC columns.

The present work aims at development of a very rapid, simple and reliable derivatization procedure based on the above reaction scheme, to be followed by a GC determination of the PFCA isobutyl esters. The method operates with micro liter samples and thus can be considered as an economically and ecologically advantageous micromethod. In combination with an efficient preconcentration technique, it should be suitable for PFCA determination in environmental samples; the development of suitable preconcentration and extraction techniques is the subject of our further research.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals

The following substances were used as the analytical standards: perfluorohexanoic acid (PFHxA, <95%, Fluka), perfluoroheptanoic acid (PFHpA, <95%), perfluorooctanoic acid (PFOA, 95%), perfluorononanoic acid (PFNA, 97%), perfluorodecanoic acid (PFDA, 98%), perfluoroundecanoic acid (PFUnA, 95%), and perfluorododecanoic acid (PFDoA, 95%), all from Aldrich. All the other chemicals, acetonitrile (<99.5%, Fluka), hexane (99%, Mallinckrodt Baker B.V., Netherlands), isobutyl chloroformate (98%, Aldrich), pyridine (99%, Aldrich), hydrochloric acid (35%, Lach-Ner, Czech Republic), ammonium acetate, isobutylalcohol, phosphoric acid, sodium hydroxide, sodium carbonate (all p.a., Penta, Czech Republic) and water (Milli-Q Plus, Millipore) were used as received.

The standard substances were dissolved in acetonitrile to prepare standard stock solutions of

10000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  PFCA. The buffer solutions (50 mM) were prepared as follows: the pyridine buffer by dissolving the appropriate amount of pyridine in water; the phosphate buffer by adjusting the pH value of the aqueous  $\text{H}_3\text{PO}_4$  with 2 M NaOH; the carbonate buffer by adjusting the pH of the aqueous  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  with 1 M HCl.

### 2.2. Instruments

AGC-ECD analyses were performed using a PU 4600 GC instrument (Unicam Analytical Systems, UK), equipped with a 15 m  $\times$  0.25 mm i. d., 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness SPB-5 column (Supelco, USA). Splitless-mode injection (sample volume, 1  $\mu\text{L}$ ) at 250  $^\circ\text{C}$  (split valve closed for 1 min) and nitrogen carrier gas (flow rate, 0.44  $\text{mL min}^{-1}$ ) were used. The oven temperature was held for 1 min at 50  $^\circ\text{C}$ , ramped at 10  $^\circ\text{C min}^{-1}$  to 170  $^\circ\text{C}$  and then held for 5 min (total run time, 23 min). The detector temperature was maintained at 300  $^\circ\text{C}$ . The pressure of make-up nitrogen was 25 kPa.

GC-EI-MS analyses were performed using a GCMS-GP5050A instrument (Shimadzu, Japan), equipped with a 30 m  $\times$  0.25 mm i. d., 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness DB-5MS column (Agilent Technologies, USA). Helium (99.999%, Linde) was used as the carrier gas with a flow rate of 1.0  $\text{mL min}^{-1}$ . Splitless-mode injection (sample volume, 1  $\mu\text{L}$ ) at 250  $^\circ\text{C}$  was employed (split valve closed for 1 min). The oven temperature was held at 40  $^\circ\text{C}$  for 3 min, ramped at 10  $^\circ\text{C min}^{-1}$  to 170  $^\circ\text{C}$  and then held for 3 min (total run time, 19 min). The mass spectrometer was operated in the selected ion monitoring (SIM) mode at  $m/z$  values 69, 131, 169 and 181 and the transfer line maintained at 300  $^\circ\text{C}$ .

### 2.3. Derivatization procedure

The reaction mixture for derivatization in the acetonitrile medium was prepared in a polypropylene vial by mixing 20  $\mu\text{L}$  sample, 161  $\mu\text{L}$  of reaction medium (acetonitrile or buffer), 8  $\mu\text{L}$  of isobutylalcohol, 1  $\mu\text{L}$  of pyridine and 10  $\mu\text{L}$  of isobutyl chloroformate (IBCF). The total volume of the reaction mixture was 200  $\mu\text{L}$  with the resultant PFOA concentration equal to 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The mixture was stirred for 20 s in an ultrasonic bath, 200  $\mu\text{L}$  of hexane were added and the isobutyl ester formed was extracted into hexane for 1 min in a shaker. The upper hexane phase was separated into a clean polypropylene vial and injected onto the gas chromatographic column.



#### 2.4. Sample preparation

Three real samples of river water, denoted as Vltava 1 to 3, were collected from the Vltava river at a site close to the Prague center, at a depth of 50 cm, into 1 L polypropylene vessels and filtered through a nylon membrane filter (47 mm in diameter, 0.45  $\mu\text{m}$ , Whatman, England). Their volume was decreased from 500 to 5 ml in a Rotavapor EL 130 (Büchi, Switzerland) rotary evaporator and concentrated phosphoric acid was added to the concentrate to attain a concentration of 50 mM. The pH was then adjusted to a value of 2.5 by adding a 2 M NaOH solution and the solution was centrifuged. The volume, 181  $\mu\text{L}$ , of this solution was subjected to the derivatization procedure, adding the appropriate amounts of isobutyl alcohol, pyridine and IBCF. The mixture was extracted with 200  $\mu\text{L}$  of hexane and injected into the GC-EI-MS system.

### 3. Results and discussion

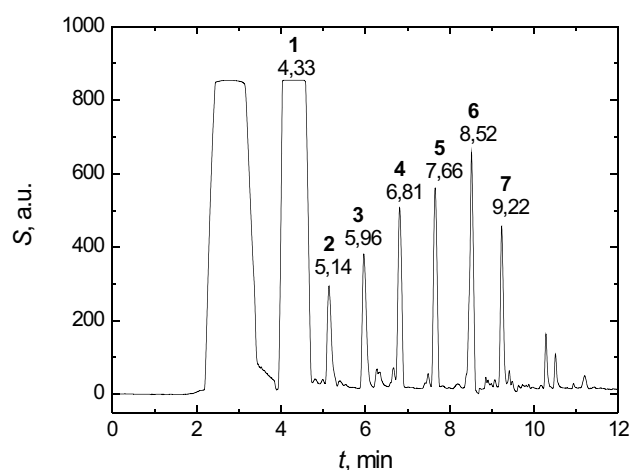
#### 3.1. Development of the derivatization procedure

The derivatization reaction in the acetonitrile medium was optimized in several steps, in order to improve its efficiency and increase the sensitivity of analytical measurements. The duration of the reaction was varied within an interval from 0 to 50 min., finding the optimum value at 8 min. The volume of pyridine was optimized within a range from 0 to 20  $\mu\text{L}$  per 200  $\mu\text{L}$  of the reaction mixture, which corresponds to the pyridine concentration range, 0.000 to 1.238 M. Variations in the volumes of the other components of the reaction mixture had negligible effects on the reaction course. Finally, the reaction temperature was optimized in the range, 20 to 60  $^{\circ}\text{C}$ , finding the lower limit to be suitable. This optimization improved the derivatization procedure efficiency by more than 60%, expressed in terms of the areas under the analyte chromatographic peaks.

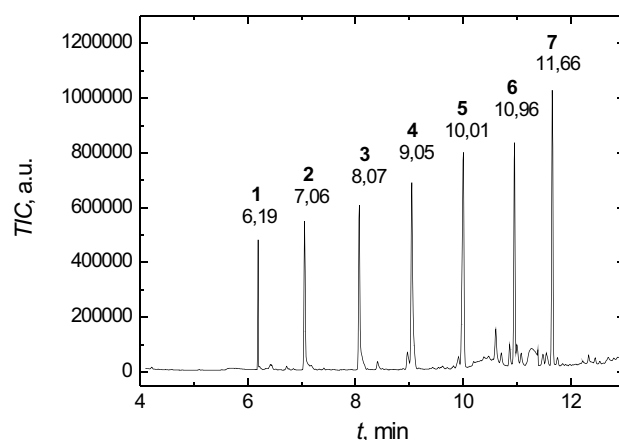
Figs. 2 and 3 depict examples of GC-ECD and GC-EI-MS chromatograms of PFCAs ( $\text{C}_6\text{--C}_{12}$ ) standards derivatized to the isobutyl esters in acetonitrile under the optimum conditions. The large peak of IBCF in Fig. 2 obscures the coeluting ibex-PFHxA peak.

#### 3.2. Column selection

The mechanism of interactions of PFCAs derivatives with stationary phases used for their separations in GC were not studied in detail yet. Therefore, separation of PFCAs isobutyl esters on eight different stationary phases was performed and compared. The highest retention was found on RTX-200MS column (trifluoro-

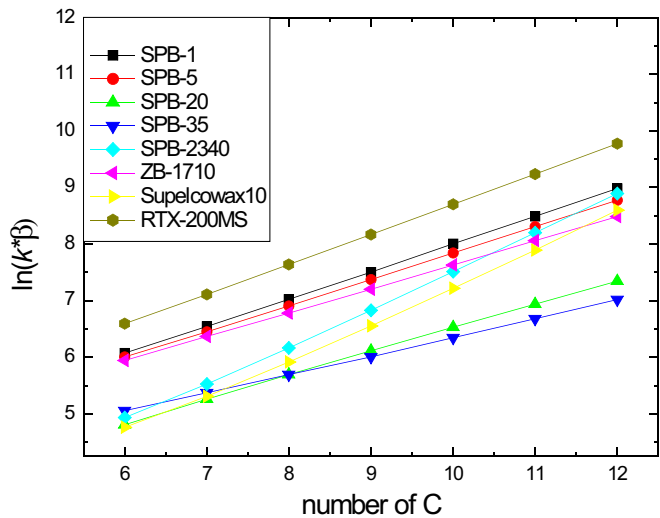


**Fig. 2.** A GC-ECD chromatogram of a mixture of perfluorinated acid standards ( $10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  of each) derivatized to isobutyl esters. An SPB-5 column ( $15\text{ m} \times 0.25\text{ mm i. d.}, 0.25\text{ }\mu\text{m}$ ); a  $1\text{ }\mu\text{L}$  sample injected (splitless, 1 min); detector temperature,  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; injector temperature,  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; column temperature,  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  (1 min) to  $170\text{ }^{\circ}\text{C}$  (5 min) in  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ; make-up gas pressure, 25 kPa, nitrogen flow rate,  $0.44\text{ mL min}^{-1}$ ; (1) IBCF, (2) ibu-PFHxA, (3) ibu-PFOA, (4) ibu-PFNA, (5) ibu-PFDA, (6) ibu-PFUnA, (7) ibu-PFDoA.



**Fig. 3.** A GC-EI-MS chromatogram of a mixture of perfluorinated acid standards ( $10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  of each) derivatized to the isobutyl esters. A DB-5MS column ( $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm i. d.}, 0.25\text{ }\mu\text{m}$ ); a  $1\text{ }\mu\text{L}$  sample injected (splitless, 1 min); MS interface temperature,  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; injector temperature,  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; temperature program:  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  (3 min) to  $170\text{ }^{\circ}\text{C}$  (3 min) in  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ; constant helium flow rate,  $1.0\text{ mL min}^{-1}$ ; SIM mode:  $m/z = 69, 131, 169$  and  $181$ ; (1) ibu-PFHxA, (2) ibu-PFHxA, (3) ibu-PFOA, (4) ibu-PFNA, (5) ibu-PFDA, (6) ibu-PFUnA, (7) ibu-PFDoA.

propyl methyl polysiloxane) followed by SPB-5 (5% phenyl methyl polysiloxane) and SPB-1 (100% methyl polysiloxane) columns. RTX-200MS is relatively new column on the market and was purchased at the end of the study. As a compromise between the retention and the analysis time, SPB-5 column was selected for further investigations. The advantage of this selection is that the majority of common GC-MS data are collected on this



**Fig. 4.** Dependence of retention factor corrected to  $\beta$  on number of carbons in PFCAs in semi logarithmic scale for eight different columns by GC-ECD, isothermal analysis (60 °C ). Columns: SPB-1 (Supelco, 30 m, 0.25 mm i. d. , film 0.25  $\mu$ m, dimethyl polysiloxane), SPB-5 (Supelco, 15 m, 0.25 mm i. d. , film 0.25  $\mu$ m, 5% diphenyl, 95% dimethyl polysiloxane), SPB-20 (Supelco, 15 m, 0.25 mm i. d. , film 1  $\mu$ m, 20% diphenyl, 80% dimethyl polysiloxane), SPB-35 (Supelco, 30 m, 0.25 mm i. d. , film 1  $\mu$ m, 35% diphenyl, 65% dimethyl polysiloxane), ZB-1701 (Phenomenex, Torrance, USA, 15 m, 0.25 mm i. d. , film 0.25  $\mu$ m, 14% cyanopropyl-phenyl, 86% dimethyl polysiloxane), Supelcowax 10 (Supelco, 30 m, 0.25 mm i. d. , film 0.25  $\mu$ m, polyethylen glykol), RTX-200MS (Restek, Bellefonte, USA, 30 m, 0.25 mm i. d. , film 0.25  $\mu$ m, trifluoropropylmethyl polysiloxane), SP-2340 (Supelco, 30 m, 0.32 mm i. d. , film 0.2  $\mu$ m 100% poly(bis-cyanopropyl siloxane)).

stationary phase and allow an easy comparison. Fig. 4 shows the dependence of  $\beta$ -corrected values of separation factor on the number of carbon atoms in PFCA molecule for the columns under test. Two columns, Supelcowax 10 (polyethylen glykol) and SP-2340 (non-bonded 100% bis-cyanopropyl polysiloxane) have higher slope which fact reflects probably a higher fraction of polar interactions of the retention mechanism compared to the less polar polysiloxane-based stationary phases. Detailed analysis of these data will be presented in separate publication.

3.3. Derivatization reaction in aqueous medium

Preliminary measurements indicated that PFCAs derivatization in aqueous media needs optimization. One of the principal parameters is the pH value of the medium and thus various buffers were tested, within a pH range from 1 to 11, at a concentration of 50 mM (to adjust the lowest pH values, 100 mM HCl was used). These aqueous buffers, pH = 1.0 (HCl), pH = 2.0, 2.5, and 3.0 (a phosphate buffer), pH = 5.0 (a pyridine buffer), pH = 7.0, 9.0, and 11.0 (a carbonate buffer), replaced acetonitrile in

the reaction mixture. The phosphate buffer with a pH = 2.5 provided the best results. The phosphate buffer concentration exerts no significant effect on the derivatization reaction; therefore, of the tested values, 1, 10, 50 and 100 mM, the concentration equal to 50 mM was further used. The amount of pyridine, as the reaction catalyst, was most important for the reaction yield in the acetonitrile medium. Therefore, the effect of the pyridine concentration was also investigated in the aqueous medium, within a range of 0.00–1.98 M, corresponding to the additions of 0–32  $\mu$ L of pyridine to obtain the total volume of the reaction mixture, 200  $\mu$ L.

When comparing the optimized PFCA derivatization in acetonitrile and in water, it can be seen that the area under the PFOA isobutyl ester GC-EI-MS peak, for the PFOA concentration, 10  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, equals 417000  $\pm$   $\pm$  30800 a. u. in the acetonitrile medium and 460000  $\pm$   $\pm$  46400 a. u. in the 50 mM aqueous phosphate buffer with a pH = 2.5. Therefore, the yield of the derivatization reaction is higher, by almost 10%, in the aqueous medium. Another advantage of the aqueous medium lies in the fact that the overall analytical procedure is much simpler, compared to the use of the non-aqueous system.

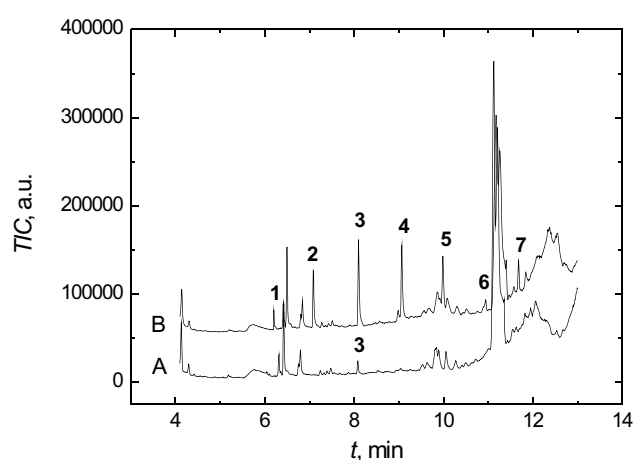
The LOD and LOQ values for the perfluorinated acid isobutyl esters obtained after derivatization in the aqueous phosphate buffer are given in Table 1. LOD (LOQ) was computed as three-times (ten-times) the standard deviation of the calibration line divided by its slope. Higher LOD and LOQ values for GC-EI-MS were observed with acids containing higher numbers of carbon atoms (C<sub>10</sub>–C<sub>12</sub>), probably due to the noise gradually increasing during the temperature gradient of the GC procedure.

**Table 1.** The limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) in  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> for the PFCAs isobutyl esters after derivatization in the aqueous phosphate buffer obtained by the GC-ECD and GC-EI-MS techniques (without preconcentration).

	GC-ECD		GC-EI-MS	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
PFHxA	–	–	0.15	0.49
PFHpA	0.3	1.1	0.06	0.19
PFOA	0.6	1.9	0.04	0.12
PFNA	0.2	0.5	0.03	0.10
PFDA	0.2	0.5	0.26	0.86
PFUnA	0.5	1.7	0.23	0.77
PFDoA	0.7	2.4	0.31	1.05

3.4. Testing of the application of the procedure

The optimized derivatization procedure in the aqueous medium was tested on three real samples of river water. A sample of distilled water spiked with a PFOA standard



**Fig. 5.** GC-EI-MS chromatograms of the Vltava 2 sample (A) and of the Vltava 2 sample with PFCAs standards added (B) (the PFCAs concentration,  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ , for the measuring conditions see Fig. 3).

was analyzed in parallel. The GC-EI-MS method was used and the yield of the derivatization reaction was found equal to 64%. This preconcentration step is the simplest possible approach and does not require any sample purification. However, it represents only a preliminary step. The use of more sophisticated methods, *e. g.*, solid-phase extraction, will probably yield better results.

In two samples (Vltava 1, Vltava 3), no perfluorinated acid was detected. The PFOA peak was found in the Vltava 2 sample, corresponding to the concentration,  $0.20 \mu\text{g mL}^{-1}$  in  $200 \mu\text{L}$  hexane, or  $3.4 \text{ ng mL}^{-1}$  in the sample. The chromatograms of the Vltava 2 sample prior (A) and after (B) the addition of PFCAs standards are given in Fig. 5.

#### 4. Conclusion

A rapid and simple micromethod has been developed for determination of perfluorinated acids ( $\text{C}_6\text{--C}_{12}$ ) by gas chromatography, after the analyte conversion into the isobutyl esters by the reaction with isobutyl chloroformate. Eight different capillary columns have been tested for separation of PFCAs isobutyl esters and SPB-5 column selected as optimum. The derivatization reaction has been optimized in the acetonitrile medium and in the medium of an aqueous phosphate buffer, with a  $\text{pH} = 2.5$  and a concentration of  $50 \text{ mM}$ , catalyzed by  $0.06 \text{ M}$  pyridine. The reaction in the aqueous phosphate buffer had a yield higher by almost 10%, compared to that in the acetonitrile medium.

The LOD (LOQ) values obtained when using the aqueous phosphate buffer are in the ranges,  $0.2\text{--}0.7$  ( $0.5\text{--}2.4$ )  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for GC-ECD and  $0.03\text{--}0.31$

( $0.10\text{--}1.05$ )  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for GC-EI-MS. These techniques have been applied to the determination of the PCFAs concentrations in three samples of the Vltava river water. None of these acids was found in two samples, while the third sample contained PFOA at a concentration of  $3.4 \text{ ng mL}^{-1}$  of the river water.s.

**Acknowledgement.** The financial support of this work by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (the project No. VZ MSM 0021620857), by the Grant Agency of Charles University in Prague (the project No. 40908) and by the Norwegian Financial Mechanism (the project No. CZ0116) is gratefully acknowledged.

#### References

- [1] Hori H., Nagaoka Y., Murayama M., Kutsuna S.: *Environ. Sci. Technol.* **42** (2008) 7438–7443.
- [2] Yamashita N., Kannan K., Taniyasu S., Horii Y., Okazawa T., Petrick G., Gamo T.: *Environ. Sci. Technol.* **38** (2004) 5522–5528.
- [3] de Voogt P., Sáez M.: *Trends Anal. Chem.* **25** (2006) 326–342.
- [4] Tseng C.L., Liu L.L., Chen C.M.: W.H. Ding, *J. Chromatogr. A* **1105** (2006) 119–126.
- [5] González-Barreiro C., Martínez-Carballo E., Sitka A., Scharf S., Gans O.: *Anal. Bioanal. Chem.* **386** (2006) 2123–2132.
- [6] Villagrasa M., López de Alda M., Barceló D.: *Anal. Bioanal. Chem.* **386** (2006) 953–972.
- [7] Weremiuk A.M., Gerstmann S., Frank H.: *J. Sep. Sci.* **29** (2006) 2251–2255.
- [8] Mawn M.P., McKay R.G., Ryan T.W., Szostek B., Powley C.R., Buck R.C.: *Analyst* **130** (2005) 670–678.
- [9] van Leeuwen S.P.J., de Boer J.: *J. Chromatogr. A* **1153** (2007) 172–185.
- [10] Li M.H.: *Environ. Toxicol.* **24** (2009) 95–101.
- [11] Renner R.: *Environ. Sci. Technol.* **42** (2008) 648–650.
- [12] Washington J.W., Henderson W.M., Ellington J.J., Jenkins T.M., Evans J.J.: *J. Chromatogr. A* **1181** (2008) 21–32.
- [13] Furdui V.I., Helm P.A., Crozier P.W., Lucaciu C., Reiner E.J., Marvin C.H., Whittle D.M., Mabury S.A., Tomy G.T.: *Environ. Sci. Technol.* **42** (2008) 4739–4744.
- [14] Belisle J., Hagen D.F.: *Anal. Biochem.* **101** (1980) 369–376.
- [15] Henderson W.M., Weber E.J., Duirk S.E., Washington J.W., Smith M.A.: *J. Chromatogr. B* **846** (2007) 155–161.
- [16] Moody C.A., Field J.A.: *Environ. Sci. Technol.* **33** (1999) 2800–2806.
- [17] Alzaga R., Bayona J.M.: *J. Chromatogr. A* **1042** (2004) 155–162.
- [18] Alzaga R., Salgado-Pentinal C., Jover E., Bayona J.M.: *J. Chromatogr. A* **1083** (2005) 1–6.
- [19] Scott B.F., Moody C.A., Spencer C., Small J.M., Muir D.C.G., Mabury S.A.: *Environ. Sci. Technol.* **40** (2006) 6405–6410.
- [20] Scott B.F., Spencer C., Mabury S.A., Muir D.C.G.: *Environ. Sci. Technol.* **40** (2006) 7167–7174.
- [21] Husek P.: *J. Chromatogr. B* **717** (1998) 57–91.
- [22] Husek P., Simek P., Matucha P.: *Chromatographia* **58** (2003) 623–630.
- [23] Husek P., Simek P.: *Curr. Pharm. Anal.* **2** (2006) 23–43.



# Retention of isobutyl esters of perfluorinated carboxylic acids on various stationary phases

Veronika Dufková, Radomír Čabala\*

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Albertov 6, 128 43 Prague 2, Czech Republic

\*Corresponding author: Radomír Čabala, Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, Albertov 6, 128 43 Prague 2, Czech Republic, [cabala@natur.cuni.cz](mailto:cabala@natur.cuni.cz), tel. +420 22195 1228

## Abstract

The retention of isobutyl esters of a homological set of perfluorinated carboxylic acids ( $C_6 - C_{12}$ ) on nine common stationary phases of wide polarity range is characterized and compared. The selected compounds behave unusually: at 60 °C, they exhibit the highest retention on fluorinated (Rtx-200MS) and non-polar (SPB-1, SPB-5) stationary phases; on the other hand, the highest contribution of  $-CF_2-$  to the retention factor  $k$  is observed on polar stationary phases (Supelcowax 10, SP-2340). The correlation between  $\log k$  and the number of perfluorinated carbon atoms in the molecule shows very good linearity ( $R^2 \geq 0.9977$ ) on all the stationary phases. Simple correlation analysis between  $\log k$  and the McReynold's parameters of the stationary phases studied reveal that polar interactions could play an important role in the retention mechanism of perfluorinated acids. Thermodynamic parameters, such as  $K_D$ ,  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  and  $\Delta S$ , were measured and calculated for the retention of perfluorinated acids on the fluorinated stationary phase (Rtx-200MS) and compared with the values obtained for a non-fluorinated analogue - octanoic acid. The analysis of these data demonstrates that the distribution of solutes between the stationary and the mobile phase is driven neither by the energy nor the entropy and that the enthalpic and the entropic contributions to the retention are almost equal for both perfluorinated and non-fluorinated acids.

## 1. Introduction

Perfluorinated organic acids (PFCAs) belong among purely anthropogenic, globally distributed chemicals with very unique physical, chemical and biological properties, closely related to their high-energy carbon - fluorine bonds ( $485 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) [1]. The intrinsic properties of PFCAs with a typical structure  $\text{F}-(\text{CF}_2)_n-\text{COOH}$ , where  $n = 1 - 13$ , are their high resistance to hydrolysis, photolysis, biodegradation and to metabolic processes in living organisms [2]. Water- and fat-repelling properties of PFCAs result in their wide use for treatment of textiles and paper, in paints, lubricants, polishes, food packages, insecticide formulations and fire-fighting foams (“supersurfactants”), as PTFE precursors, and in the photographic and the semi-conductor industries [3-9]. Their emissions over the period from 1951 to 2004 have been estimated to equal 3200-7300 tons [10,11] and they are nowadays globally distributed in the environment. In 2005, EPA’s science advisory board recommended classification of perfluorooctanoic acid (PFOA) as a “likely” human carcinogen [12].

Nowadays, analyses for PFCAs are mostly carried out by means of HPLC-MS(-MS) to meet the requirements of high sensitivity and selectivity [13-17]. However, many laboratories are not equipped with this sophisticated instrumentation and would prefer readily available GC techniques. Owing to the sufficient volatility (with respect to typical GC methods), PFCAs should theoretically be directly determinable by GC, but their chromatographic behavior results in peaks with pronounced tailing on common stationary phases because of their high polarity. Consequently, they are converted into more volatile and less polar derivatives using various procedures. The published works describe their derivatization to the methyl esters [18-20], butyl esters [21, 22], 2,4-difluoroanilides [23, 24], and, recently, isobutyl esters [25]. Surprisingly, there are no published data characterizing the physico-chemical behavior of PFCAs in GC systems. This lack of data and our own interest has induced us to start working on a partial filling of this gap.

Therefore, the goals of this work are (a) a comparison of the retention of a homologous set of PFCA isobutyl esters ( $\text{C}_6 - \text{C}_{12}$ ) on common stationary phases and (b) the calculation of selected thermodynamic parameters ( $K_D$ ,  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  and  $\Delta S$ ) for PFCAs on fluorinated stationary phase Rtx-200MS.

### *Thermodynamic background of GC retention*

The retention in GC is mainly governed by the surface and bulk interactions of the solute with the stationary phase. These interactions can be described using the basic retention parameter – the specific retention volume,  $V_g$ , which is characteristic of the particular solute, stationary phase and carrier gas. The value of  $V_g$  can easily be related to thermodynamic quantities; the detailed thermodynamic theory of GC is described elsewhere [26, 27]. The  $V_g$  value ( $\text{mL g}^{-1}$ ) can be calculated from the experimental parameters according to the relationship,

$$V_g = (t_R - t_M) j_{mn} F \frac{273.15}{w T_c} \quad (1)$$

where  $t_R$  (min) and  $t_M$  (min) are the retention times of the test solute and of an inert species (e.g., methane marker), respectively,  $T_c$  (K) is the column temperature,  $F$  ( $\text{mL min}^{-1}$ ) is the flow-rate of the carrier gas at the column outlet measured at  $T_c$  (K),  $w$  (g) is the mass of the stationary phase in the column and  $j_{mn}$  is the compressibility correction factor which depends on the inlet,  $p_i$  (Pa), and outlet,  $p_o$  (Pa), pressures. The  $j_{mn}$  value is calculated using the following equation [26];

$$j_{mn} = \frac{m}{n} \left[ \frac{(p_i/p_o)^n - 1}{(p_i/p_o)^m - 1} \right] \quad (2)$$

Values of  $m = 3$  and  $n = 2$  are commonly used to calculate  $j_{mn}$  with a sufficient accuracy.

When the stationary phase is in a condensed state (liquid or solid), then the ratio of  $\log V_g$  and the reciprocal value of the temperature yields a straight line within a temperature range in which the heat capacity of the solute does not change dramatically. The slope of this straight line is related to the partial molar enthalpy of the solution,  $\Delta H$  ( $\text{J mol}^{-1}$ ),

$$\ln V_g = \frac{\Delta H}{RT_c} + \frac{\Delta S}{R} + C \quad (3)$$

where  $R$  ( $\text{J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ) is the universal gas constant,  $T_c$  (K) is the column temperature and  $C$  is integration constant which can usually be neglected.

The standard partial molar Gibbs energy of the solution,  $\Delta G^\circ$  ( $\text{J mol}^{-1}$ ), for the solute  $i$  at thermodynamic equilibrium in the carrier gas – stationary phase system is given by the general equation,

$$\Delta G^0 = \mu_{is}^0 - \mu_{im}^0 = -RT \ln \left( \frac{f_{is}/f_{is}^0}{f_{im}/f_{im}^0} \right) \quad (4)$$

where  $\mu_{is}^0$  and  $\mu_{im}^0$  are the standard chemical potentials,  $f_{is}$  and  $f_{im}$  are the fugacities of solute  $i$  in the stationary ( $s$ ) and mobile ( $m$ ) phases, respectively,  $f_{is}^0$  and  $f_{im}^0$  are the respective fugacities of the solute in standard (reference) states [28]. The prerequisite of the equilibrium is approximately valid only in the centre of the solute chromatographic zone; therefore, it is related to the chromatographic data derived from the peak maximum. If we want to calculate  $\Delta G$  from experimentally accessible parameters, it is necessary to specify the standard states of the solute in both the phases [29]. This can be done by the definition of (a) the concentration units, (b) the standard concentrations of the solute in both the phases, and (c) by the normalization of the solute activity coefficient in the condensed phase. The way of doing this depends on the character of the effect to be quantified. In our case of infinite dilution of the solute in both the phases, the standard states are selected as follows. The stationary phase: (a) the concentration in terms of the mole fraction,  $x_{is}$ , (b) the reference solute concentration  $x_{is}^0 = 1$ , and (c) the activity coefficient  $\gamma_{is} = 1$  for  $x_{is} \rightarrow 0$ . The mobile phase: (a) concentration in mole fraction,  $x_{im}$ , (b) the solute reference concentration  $x_{im}^0 = 1$  at the reference pressure,  $p^0 = 101325$  Pa. For the solute actual and reference fugacities in the stationary and the mobile phases it is obtained,

$$f_{is} = \gamma_{is} h_i x_{is} \quad \text{and} \quad f_{is}^0 = h_i x_{is}^0 = h_i \quad (5a)$$

$$f_{im} = v_{im} p x_{im} \quad \text{and} \quad f_{im}^0 = 1 \quad (5b)$$

where  $h_i$  is Henry's constant for the solute,  $v_{im}$  is the fugacity coefficient of the solute in its mixture with the carrier gas at temperature  $T_c$  and pressure  $p$ . This way of the activity coefficient normalization reflects the deviations of the system from Henry's law. After the specification of the reference states, Eq. 4 can be rearranged to obtain

$$\Delta G = -RT_c \ln \left[ V_g \frac{\gamma_{is} M_s}{273.15 v_{im} z_m R} \right] \quad (6)$$

where  $M_s$  is the relative molecular weight of the stationary phase and  $z_m$  is the compressibility factor of the mobile phase [30].

In a system where the stationary phase is chemically not defined, e.g., the value of  $M_s$  is not known, the definition of the standard states has to be modified. The best and easiest way is to define the concentration of the solute in the stationary phase in terms of the molality,  $m_{is}$ , the reference molality,  $m_{is}^0 = 1$  and the respective molal activity coefficient  $\gamma_{is}^m = 1$  at  $m_{is} \rightarrow 0$ . This will change the Eq. 5a into the form,

$$f_{is}^m = \gamma_{is}^m l_i m_{is} \quad \text{and} \quad f_{is}^{0m} = l_i \quad (7)$$

where  $l_i$  is a constant (similar to  $h_i$ ) relating  $f_{is}^m$  and  $m_{is}$  in the region of infinite dilution. When relating  $x_{is}$  with  $m_{is}$  for infinite dilution, where  $\gamma_{is} \rightarrow 1$  and  $\gamma_{is}^m \rightarrow 1$ , it is possible to write [30]

$$\frac{x_{is}}{m_{is}} \approx \frac{M_s}{1000} \quad (8)$$

After rearranging Eq. 6 with respect to Eq. 8, Eq. 9 is obtained.

$$\Delta G = -RT_c \ln \left[ V_g \frac{\gamma_{is}^m 1000}{273.15 v_{im} z_m R} \right] \quad (9)$$

Under conditions of infinite dilution and a small pressure drop along the capillary column, coefficients  $\gamma_{is}^m$ ,  $\gamma_{im}$  and  $z_m$  approach unity. If the value of  $M_s$  of the stationary phase used is not accessible, Eq. 9 can be used to calculate  $\Delta G$  values for the analytes tested [30].

Having  $\Delta G$  and  $\Delta H$  calculated, the partial molar entropy,  $\Delta S$  ( $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ ), at temperature  $T_c$  can be obtained from the relationship,

$$\Delta S = - \left( \frac{\partial \Delta G}{\partial T} \right)_p = \frac{(\Delta H - \Delta G)}{T_c} \quad (10)$$

Using Eq. 8 at temperature  $T_c$ , the distribution constant of the solute between the stationary and the mobile phase,  $K_D$ , is related to specific retention volume  $V_g$  by Eq. 11 [31]

$$K_D = V_g \frac{T_c \rho_{sp}}{273.15} \quad (11)$$

where  $\rho_{sp}$  ( $\text{g cm}^{-3}$ ) is the stationary phase density (the change of the density with temperature is neglected here).

## 2. Experimental

### 2.1. Standards and reagents

The following substances were used as the analytical standards: caprylic acid (<98 %) and perfluorohexanoic acid (PFHxA, <95 %, both Fluka, Steinheim, Germany), perfluoroheptanoic acid (PFHpA, <95 %) perfluorooctanoic acid (PFOA, 95 %), perfluorononanoic acid (PFNA, 97 %), perfluorodecanoic acid (PFDA, 98 %), perfluoroundecanoic acid (PFUnA, 95 %) and perfluorododecanoic acid (PFDoA, 95 %, all from Aldrich, Steinheim, Germany). All the other chemicals, acetonitrile (<99.5 %, Fluka, Steinheim, Germany), hexane (99 %, Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Netherlands), isobutyl chloroformate (98 %, Aldrich, Steinheim, Germany), pyridine (99 %, Aldrich, Steinheim, Germany), hydrochloric acid (35 %, Lach.-Ner, s.r.o., Neratovice, Czech Republic), isobutyl alcohol, phosphoric acid, (all p.a., Penta, Chrudim, Czech Republic) and water (Milli-Q Plus, Millipore) were used as received.

The standard substances were dissolved in acetonitrile to prepare standard stock solutions of 100 mg mL<sup>-1</sup> PFCAs.

### 2.2. Instruments and columns

GC-ECD analyses were performed using a PU 4600 GC instrument (Unicam Analytical Systems, Cambridge, UK). The following capillary columns were used: SPB-1 (30 m, 0.25 mm ID, thickness 0.25 µm, dimethyl polysiloxane), SPB-5 (15 m, 0.25 mm ID, thickness 0.25 µm, 5 % diphenyl, 95 % dimethyl polysiloxane), SPB-20 (15 m, 0.25 mm ID, thickness 1 µm, 20 % diphenyl, 80 % dimethyl polysiloxane), SPB-35 (30 m, 0.25 mm ID, thickness 1 µm, 35 % diphenyl, 65 % dimethyl polysiloxane), Supelcowax 10 (30 m, 0.25 mm ID, thickness 0.25 µm, polyethyleneglycol), SP-2340 (30 m, 0.32 mm ID, thickness 0.2 µm, 100 % poly(bis-cyanopropyl) siloxane), SLB-IL100 (30 m, 0.25 mm ID, thickness 0.2 µm, [1,9-di(3-vinylimidazolium) nonane bis(trifluoromethyl) sulfonyl imidate]), all from Supelco, Bellefonte, USA, ZB-1701 (15 m, 0.25 mm ID, thickness 0.25 µm, 14 % cyanopropyl-phenyl, 86 % dimethyl polysiloxane, Phenomenex, Torrance, USA), Rtx-200MS (30 m, 0.25 mm ID, thickness 0.25 µm, trifluoropropylmethyl polysiloxane, Restek, Bellefonte, USA).

### 2.3. Derivatization procedure

The reaction mixture for derivatization was prepared in a polypropylene (PP) vial by mixing 20 µL of the 100 µg mL<sup>-1</sup> mixture of PFCAs solution or caprylic acid solution, 161 µL of phosphate buffer (pH = 2.5, 50 mmol L<sup>-1</sup>), 8 µL of isobutyl alcohol, 1 µL of pyridine and 10 µL of isobutyl chloroformate (IBCF). The total volume of the reaction mixture was 200 µL with the resultant PFCAs concentration equal to 10 µg mL<sup>-1</sup>. The mixture was stirred for 20 s in an ultrasonic bath, 200 µL of hexane were added and the isobutyl ester formed was extracted into hexane for 1 min in a shaker. The upper hexane phase was separated into a clean PP vial and injected onto the GC [25].

### 2.4. GC conditions

GC analyses were performed at constant temperatures of 60, 70, 80 and 90 °C. Split mode injection (sample volume 1 µL, split ratio 1:50) at 250 °C and nitrogen carrier gas (flow rate 1 mL min<sup>-1</sup>) were used. The pressure of make-up nitrogen was 125 kPa and the detector temperature was maintained at 300 °C. All the capillary columns were equilibrated according to the manufacturer recommendations.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Retention characteristics of isobutyl esters of PFCAs on various stationary phases

The mechanism of interactions of PFCAs derivatives with the stationary phases used for their GC separations has not yet been studied in detail. Therefore, the separations of PFCAs isobutyl esters on nine different stationary phases have been performed and compared. Fig. 1 demonstrates that the logarithm of retention factor *k* (corrected by the phase ratio because of different thicknesses of the stationary phase films in the columns used) depends linearly ( $R^2 \geq 0.9977$ ) on the number of perfluorinated carbon atoms contained in the PFCa molecule in all the stationary phases. This implies that the retention mechanism is independent of the number of carbon atoms and that the contribution of the -CF<sub>2</sub>- group to the retention is constant within the set of the homologues studied.

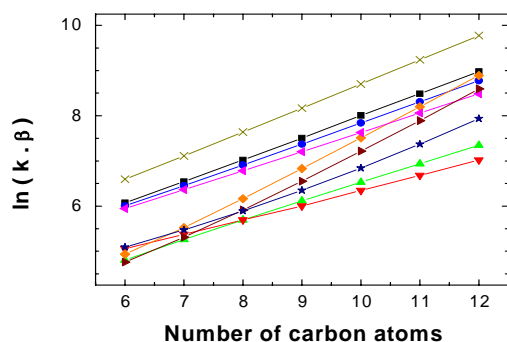


Fig. 1. Dependence of logarithm of retention factor  $k$  corrected to column phase ratio  $\beta$  on number of perfluorinated carbon atoms in PFCAs for 9 different stationary phases by GC-ECD, isothermal analysis (60 °C). Stationary phases: SPB-1 (■), SPB-5 (●), SPB-20 (▲), SPB-35 (▼), SPB-2340 (◆), ZB-1701 (◄), Supelcowax 10 (►), Rtx-200MS (×), SLB-IL100 (★)

The  $k$  values differ for the individual columns and the highest retention occurs on the Rtx-200MS column (trifluoropropylmethyl polysiloxane), followed by the SPB-1 (100 % methyl polysiloxane) and SPB-5 (5 % phenyl-methyl polysiloxane) columns. The highest retention on the polyfluorinated stationary phase is obvious (*similia similibus solvuntur*) and the retention on the second and the third column demonstrates the tendency of the test PFCAs to prefer nonpolar stationary phases. Interestingly, Supelcowax 10 (polyethyleneglycol) and SP-2340 (non bonded 100 % bis-cyanopropyl polysiloxane) exhibit markedly higher slopes, reflecting a greater contribution of the  $-\text{CF}_2-$  group to the overall retention on these columns. This fact can be explained by a higher contribution of polar interactions to the retention mechanism, compared to the less polar polysiloxane-based stationary phases. In view of the higher slopes obtained for these two polar columns, compared to the Rtx-200MS column, we can predict that the order of the  $k$  values would probably change at perfluoroeicosanoic acid for the SP-2340 column and at perfluorotetraeicosanoic acid for the Supelcowax 10 column. To roughly assess the contributions of different types of interactions between the analytes and the stationary phase to the retention, McReynolds' classification of stationary phases has been used [32, 33] (for McReynolds' constants of the stationary phases used see Table 1; the data for Rtx-200MS and SLB-IL100 are not yet available).

Table 1 – McReynolds' parameters of used stationary phases [35, Supelco catalogue]

Stationary phase	McReynolds' parameters					
	$x'$	$y'$	$z'$	$u'$	$s'$	$\Sigma$
SPB-1	4	58	43	56	38	199
SPB-5	19	74	64	93	62	312
SPB-20	67	116	117	174	131	605
ZB-1701	67	170	153	228	171	789
SPB-35	101	146	151	219	202	819
Supelcowax 10	305	551	360	562	484	2262
SPB-2340	419	654	541	758	637	3009

The McReynolds' parameters  $x'$  (representing charge-transfer, donors),  $y'$  (hydrogen bonding, donors),  $z'$  (orientation),  $u'$  (charge-transfer, acceptors),  $s'$  (hydrogen bonding, acceptors) [33] and their sum have been correlated with the slopes of the lines in Fig. 1. In general, these correlations are poor. Excluding the two columns with the higher slopes, Rtx-200MS and Supelcowax 10, from the data set, only a weak correlation has been found between the slopes and McReynolds' coefficients:  $R^2$  values are 0.8894 for  $x'$ , 0.8173 for  $s'$ , 0.7143 for the sum, 0.6660 for  $z'$  and 0.5086 for  $y'$ . Therefore, the best correlation with parameters  $x'$  and  $s'$  describing the charge-transfer forces and hydrogen bonding, respectively, indicates that these polar interactions could play an important role in the retention of perfluorinated acids on the stationary phases selected. It should be emphasized that these more or less qualitative relationships do not provide any rigorous quantitative data and

## Příloha 5

more detailed work is necessary to further analyze and quantitatively describe the retention behavior of the analytes studied.

Summarizing the data obtained, it can be stated that the PFCAs isobutyl esters ( $C_6 - C_{12}$ ) behave unusually. On one hand, they exhibit the highest retention on nonpolar stationary phases under the given conditions and, on the other hand, the highest contribution of  $-CF_2-$  group to  $k$  and the best correlation with  $x'$  and  $s'$  McReynolds parameters is observed on polar stationary phases. Such equivocal behavior is typical for perfluorinated compounds and thus any prediction of their behavior is difficult.

### 3.2. Retention of isobutyl esters of PFCAs on the Rtx-200MS column

To calculate the thermodynamic parameters, the Rtx-200MS column was selected, owing to the highest retention of selected PFCAs isobutyl esters on this column. An example of the PFCAs isobutyl esters separation on this column is depicted in Fig. 2.

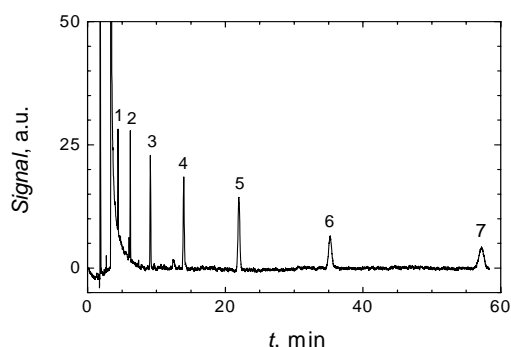


Fig. 2. A GC-ECD chromatogram of a mixture of perfluorinated acid standards ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  of each) derivatized to isobutyl esters. Conditions: Rtx-200MS column ( $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm ID}$ ,  $0.25 \mu\text{m}$ );  $1 \mu\text{L}$  sample (split ratio 1:50); detector  $300^\circ\text{C}$ ; injector  $250^\circ\text{C}$ ; isothermal analysis at  $70^\circ\text{C}$ , isobutyl esters of 1 – PFHxA, 2 – PFHpA, 3 – PFOA, 4 – PFNA, 5 – PFDA, 6 – PFUnA, 7 – PFDoA

The data necessary for further calculations were obtained from the manufacturer: the density of the stationary phase,  $1.284 \text{ g mL}^{-1}$ , the film thickness,  $0.25 \mu\text{m}$ , the volume and weight of the stationary phase in the column,  $0.8836 \text{ mL}$  and  $1.1345 \text{ g}$ , respectively. The column manufacturer has published no information on the average molar mass of the stationary phase, therefore, Eqs. 3, 9 and 10 have been used to compute the following data, which are presented in Table 2, together with their confidence intervals at  $(1-\alpha)$  equal to 0.95.

Table 2 – Thermodynamic parameters of isobutyl esters of perfluorinated organic acids and octanoic acid measured on Rtx-200MS column

Acid	$V_g (\text{mL g}^{-1})^*$	$K_D^*$	$\Delta H (\text{kJ mol}^{-1})$	$\Delta G (\text{kJ mol}^{-1})^*$	$\Delta S (\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1})^*$
PFHxA	$7.3 \pm 0.1$	$11.8 \pm 0.1$	$46.4 \pm 0.5$	$-3.33 \pm 0.03$	$145 \pm 2$
PFHpA	$11.9 \pm 0.1$	$19.2 \pm 0.1$	$49.6 \pm 0.6$	$-4.72 \pm 0.02$	$158 \pm 2$
PFOA	$19.4 \pm 0.1$	$31.3 \pm 0.1$	$52.8 \pm 0.6$	$-6.12 \pm 0.01$	$172 \pm 2$
Octanoic	$153.3 \pm 0.3$	$247.2 \pm 0.3$	$61.3 \pm 0.6$	$-12.02 \pm 0.01$	$214 \pm 2$
PFNA	$31.8 \pm 0.1$	$51.3 \pm 0.1$	$56.1 \pm 0.7$	$-7.53 \pm 0.01$	$185 \pm 2$
PFDA	$52.4 \pm 0.0$	$84.5 \pm 0.0$	$59.4 \pm 0.7$	$-8.95 \pm 0.00$	$199 \pm 2$
PFUnA	$86.2 \pm 0.3$	$139.0 \pm 0.3$	$62.6 \pm 0.9$	$-10.37 \pm 0.01$	$213 \pm 3$
PFDoA	$142.4 \pm 0.3$	$229.7 \pm 0.3$	$65.9 \pm 0.9$	$-11.81 \pm 0.01$	$226 \pm 3$

\* values measured at  $70^\circ\text{C}$

The relationships between the number of perfluorinated carbon atoms in PFCAs and  $\ln V_g$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta G$  and  $\Delta S$  values are perfectly linear (all with  $R^2 \approx 1$ ). This fact indicates that the theoretical assumptions concerning the

## Příloha 5

system behavior are fulfilled and the calculation of further parameters is possible. Fig. 3 depicts the linear relationship between the logarithms of  $V_g$  and  $1/T$  (the Van't Hoff curves) [26, 27, 34], where the slopes of the lines represent the molar enthalpies of dissolution divided by the universal gas constant,  $\Delta H/R$ .

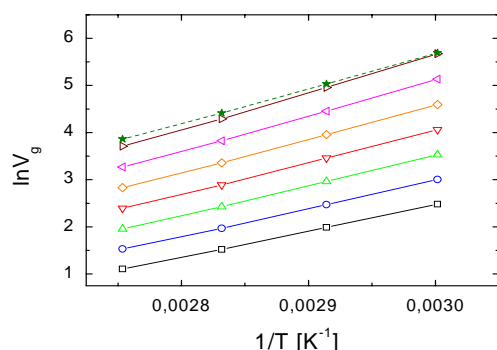


Fig. 3. Dependence of logarithm of specific retention volume  $V_g$  on  $1/T$  (Van't Hoff curves) for PFCAs isobutyl esters and octanoic (caprylic) acid isobutyl ester on column Rtx-200MS. Isobutyl esters of octanoic acid (★), PFHxA (■), PFHpA (●), PFOA (▲), PFNA (▼), PFDA (◆), PFUnA (◄) and PFDoA (►)

To compare the  $\Delta H$  values with that obtained for a non-fluorinated fatty acid, octanoic (caprylic) acid (OA) was added to the set of analytes. As expected, it can be seen from Table 2 and Fig. 3 that the perfluorination of the acyl moiety of the molecule strongly decreases the PFOA retention, compared to its non-fluorinated analogue, OA. The comparison of the contributions of  $\Delta H/RT$  and  $\Delta S/R$  to the  $\ln V_g$  value revealed that the entropic contribution represents 112 % and 120 % of the enthalpic one for PFOA and OA, respectively. The entropic contribution with the other PFCAs is in the range between 107 and 118 % of the enthalpic one. These values show that the sorption of PFCAs and OA in the selected fluorinated stationary phase is neither “energy” nor “entropically” driven [34] and that both the parameters contribute to the retention almost equally. It means that the analyte distribution between the stationary and mobile phases is not governed by mere interaction with the stationary phase but that the interaction with the mobile phase is also significant.

The slightly higher entropic contribution, which is a measure of the degree of randomness that a solute molecule experiences in the fluorinated stationary phase, shows that the solute molecules are more restricted or less randomly distributed in the stationary phase and this loss of freedom is indispensably co-responsible for the solute retention. The values of  $V_g$  and  $K_D$  of PFOA are approximately 8 times smaller compared to OA, and the values for OA are comparable with those for PFDoA. The values of  $\Delta H$  and  $\Delta S$  for PFOA are comparable with those for OA, whereas the value of  $\Delta G$  is approximately two times higher for OA. We will test by future experiments whether these differences in the thermodynamic constants are also valid also for acids with shorter carbon chains. The temperature dependence of the  $V_g$  and  $K_D$  values for PFOA and OA is presented in Table 3. A somewhat steeper decrease of these values for OA compared to PFOA is in agreement with the higher value of  $\Delta H$  for OA.

Table 3 – Values of specific retention volume and distribution constants of isobutyl esters of PFOA and octanoic acid measured on Rtx-200MS column at different temperatures

Column temperature [K]	$V_g$ [mL g <sup>-1</sup> ]		$K_D$	
	Perfluorooctanoic acid	Octanoic acid	Perfluorooctanoic acid	Octanoic acid
323.15	63.3	597.6	96.2	907.8
333.15	34.1	295.5	53.4	462.7
343.15	19.4	153.3	31.2	247.2
353.15	11.3	82.6	18.8	137.0
363.15	7.1	47.6	12.1	81.3

To better understand the type of interactions preferred between the Rtx-200MS stationary phase (trifluoropropylmethyl polysiloxane) and the selected isobutyl esters of PFCAs, Abraham's Linear Free Energy

Relationship (LFER) approach [35] was applied, in order to evaluate the perfluorinated stationary phase descriptors with the help of the PFCA substance descriptors and to resolve the different types of interactions and their contributions to the overall PFCA retention (expressed in terms of retention factor  $k$ ). It has been found that the descriptors for perfluorinated acids and the stationary phase used are not available. Therefore, the substance descriptors have been computed ( $\Sigma\alpha^H_2$  – acidity,  $\Sigma\beta^H_2$  – basicity,  $\pi^H_2$  – polarizability,  $\log L^{16}$  – gas-hexadecane partition,  $V_x$  – characteristic volume,  $R_2$  – excess molar refraction), for more details see [35]) for PFCA with the ACD/ADME Suite 5.0 - Absolv software. Multiregression analysis of the resultant parameters has shown that all the calculated descriptors are statistically dependent (intercorrelated) within the homologous series of PFCA and, thus they cannot be further used for reliable fitting to the  $\log k$  values within Abraham's equation [35]. This fact shows that this approach is not suitable and that the stationary phase descriptors will have to be determined with the help of standards whose substance descriptors are known [35]. This is the subject of our present work.

## 4. Conclusions

The retention of isobutyl esters of perfluorinated carboxylic acids ( $C_6 - C_{12}$ ) on nine common stationary phases covering a broad polarity range has been characterized and compared. The highest retention has been found on the Rtx-200MS column (trifluoropropylmethyl polysiloxane), followed by the SPB-1 (100 % methyl polysiloxane) and the SPB-5 (5 % phenyl- methyl polysiloxane) columns. The highest contribution of  $-CF_2-$  to the retention factor  $k$  has been observed on the polar stationary phases Supelcowax 10 (polyethylene glycol) and SP-2340 (100 % poly(bis-cyanopropyl) siloxane). The correlation between  $\log k$  and the number of perfluorinated carbon atoms in the PFCA molecules has shown very good linearity ( $R^2 \geq 0.9977$ ) for all the stationary phases. Correlation analysis between  $\log k$  and McReynold's parameters of the stationary phases used has revealed that the best correlation ( $R^2 \geq 0.8173$ ) holds for the parameters describing donating charge-transfer and hydrogen bonding interactions, therefore, the retention mechanism of perfluorinated acids should be preferentially based on these polar interactions. The fluorinated stationary phase (Rtx-200MS) has been selected for the calculation of thermodynamic parameters, such as  $K_D$ ,  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  and  $\Delta S$ . The retention of perfluorinated acids has been compared with that of a non-fluorinated analogue - octanoic acid. The data calculated have shown that the distribution of both the perfluorinated and non-fluorinated solutes between the fluorinated stationary and mobile phase is controlled by enthalpy and entropy to a similar extent. The lack of data on the solute and the stationary phase descriptors for Abraham's approach has made a detailed analysis of the contributions of basic interactions to the overall retention impossible at present.

## Acknowledgements

The Projects Nos. 40908 and SVV 261204 of the Grant Agency of the Charles University, Research Projects MSM 0021620857 and RP14/63 of the Ministry of Education, Youth and Sports, the project IAAX00100903 of the Grant Agency of the Czech Academy of Science and the Project No. CZ0116 of the Norwegian Financial Mechanism are gratefully acknowledged for the financial support.

## References

- [1] P. de Voogt, M. Sáez, Trends Anal. Chem. 25 (2006) 326.
- [2] C.L. Tseng, L.L. Liu, C.M. Chen, W.H. Ding, J. Chromatogr. A 1105 (2006) 119.
- [3] C.R. Powley, M.J. Michalczyk, M.A. Kaiser, L.W. Buxton, Analyst 130 (2005) 1299.
- [4] C. González-Barreiro, E. Martínez-Carballo, A. Sitka, S. Scharf, O. Gans, Anal. Bioanal. Chem. 386 (2006) 2123.
- [5] M. Villagrasa, M. López de Alda, D. Barceló, Anal. Bioanal. Chem. 386 (2006) 953.
- [6] M.A. Kaiser, B.S. Larsen, C.C. Kao, R.C. Buck, J. Chem. Eng. Data 50 (2005) 1841.
- [7] A.M. Weremiuk, S. Gerstmann, H. Frank, J. Sep. Sci. 29 (2006) 2251.
- [8] J.W. Martin, D.C.G. Muir, C.A. Moody, D.A. Ellis, W.C. Kwan, K.R. Solomon, S.A. Mabury, Anal. Chem. 74 (2002) 584.
- [9] M.P. Mawn, R.G. McKay, T.W. Ryan, B. Szostek, C.R. Powley, R.C. Buck, Analyst 130 (2005) 670.
- [10] S.P.J. van Leeuwen, J. de Boer, J. Chromatogr. A 1153 (2007) 172.
- [11] K. Prevedouros, I.T. Cousins, R.C. Buck, S.H. Korzeniewski, Environ. Sci. Technol. 40 (2006) 32.
- [12] R. Renner, Environ. Sci. Technol. 42 (2008) 648.
- [13] B.G. Loganathan, K.S. Sajwan, E. Sinclair, K.S. Kumar, K. Kannan, Water Res. 41 (2007) 4611.



## Příloha 5

- [14] J.W. Washington, W.M. Henderson, J.J. Ellington, T.M. Jenkins, J.J. Evans, J. Chromatogr. A 1181 (2008) 21.
- [15] V.I. Furdul, P.A. Helm, P.W. Crozier, C. Lucaciu, E.J. Reiner, C.H. Marvin, D.M. Whittle, S.A. Mabury, G.T. Tomy, Environ. Sci. Technol. 42 (2008) 4739.
- [16] A.M. Becker, S. Gerstmann, H. Frank, Chemosphere 72 (2008) 115.
- [17] M.K. So, Y. Miyake, W.Y. Yeung, Y.M. Ho, S. Taniyasu, P. Rostkowski, N. Yamashita, B.S. Zhou, X.J. Shi, J.X. Wang, J.P. Giesy, H. Yu, P.K.S. Lam, Chemosphere 68 (2007) 2085.
- [18] J. Belisle, D.F. Hagen, Anal. Biochem. 101 (1980) 369.
- [19] W.M. Henderson, E.J. Weber, S.E. Duirk, J.W. Washington, M.A. Smith, J. Chromatogr. B 846 (2007) 155.
- [20] C.A. Moody, J.A. Field, Environ. Sci. Technol. 33 (1999) 2800.
- [21] R. Alzaga, C. Salgado-Pentinal, E. Jover, J.M. Bayona, J. Chromatogr. A 1083 (2005) 1.
- [22] R. Alzaga, J.M. Bayona, J. Chromatogr. A 1042 (2004) 155.
- [23] B.F. Scott, C.A. Moody, C. Spencer, J.M. Small, D.C.G. Muir, S.A. Mabury, Environ. Sci. Technol. 40 (2006) 6405.
- [24] B.F. Scott, C. Spencer, S.A. Mabury, D.C.G. Muir, Environ. Sci. Technol. 40 (2006) 7167.
- [25] V. Dufková, R. Čabala, D. Maradová, M. Štícha, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 8659.
- [26] J.R. Conder, C.L. Young: Physicochemical Measurement by Gas Chromatography, Wiley, New York (1979).
- [27] H. Purnell, Gas Chromatography, Wiley, New York (1962).
- [28] J.C. Giddings, Dynamics of Chromatography, M. Dekker, New York (1965).
- [29] Denbigh K., The principles of Chemical Equilibrium, Cambridge University Press, Cambridge (1957).
- [30] J. Novák, Chemické listy, 72 (1978) 1043.
- [31] A.B. Littlewood, Gas Chromatography, Academic Press, New York, London (1962) p. 46.
- [32] W.O. McReynolds, J. Chromatogr. Sci. 8 (1970) 685.
- [33] V. Pacáková, L. Feltl, Chromatographic retention indices, Ellis Horwood Ltd., Chichester (1992) p.115-118.
- [34] R.P.W. Scott, Principles and Practice of Chromatography, Library for Science, LLC, (2003) <http://www.library4science.com/>.
- [35] M.H. Abraham, C.F. Poole, S.K. Poole, J. Chromatogr. A 842 (1999) 79.